

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 79 • № 4 • 2024 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

От редакции

- Кирпичников М.П., Ильина Н.А., Ахаев Д.Н., Белякова Г.А.,
Осмоловский А.А. Концепция развития биологического образования
в Российской Федерации 253

Обзоры

- Малахов В.В., Ежова О.В., Екимова И.А., Ганцевич М.М.
Общие закономерности онтогенеза *Ambulacraria* 259
- Фетисова Е.К., Воробьева Н.В., Мунтян М.С. Рассеянный склероз.
Некоторые особенности патологии и возможные пути терапии. Часть 2 269
- Миронова Т.В., Таганович А.Д., Кадушкин А.Г., Макаревич В.В.,
Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Роль компонентов иммунного ответа
первого и семнадцатого типов в развитии аллергических заболеваний
дыхательной системы. 280

Оригинальные исследования

- Куприянова Е.В., Манахова К.А., Ежова Т.А. Взаимодействующие гены
PARG1 и *EXA1* являются важными регуляторами аутоиммунитета у растений . . . 287
- Александров О.С., Романов Д.В. Изучение структурных особенностей
нетранскрибируемых спейсеров 5S-рДНК *Citrus sinensis* и *C. reticulata* 298
- Гудкова В.Р., Гвоздев Д.А., Цораев Г.В., Мойсенович А.М.,
Максимов Е.Г. Осветительная установка для определения эффективности
действия фотосенсибилизаторов в отношении клеточных культур на основе
светодиодов высокой мощности 306
- Соколова И.Б., Шуваева В.Н. Динамика развития системной
воспалительной реакции и нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации
церебральных артерий 315
- Лобанова А.А., Коровина А.Н., Кошкина Д.О., Черникова П.А.,
Феофанов А.В., Студитский В.М., Нилов Д.К., Малюченко Н.В.
Гель-электрофорез как метод классификации ингибиторов поли(АДФ-
рибоза)-полимераз 1 и 2 322

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2024

Варыбок С.Д., Онипченко В.Г., Гулов Д.М., Елумеева Т.Г. Функциональные признаки растений и разнообразие субальпийских пестрокостровых лугов Северо-Западного Кавказа	330
Репкова М.Н., Зарытова В.Ф., Мазурков О.Ю., Мазуркова Н.А., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И., Некрасов М.Д., Купрюшкин М.С., Левина А.С. Эффективное ингибирование репликации вируса простого герпеса 1-го типа <i>in vitro</i> с помощью олигонуклеотид-содержащих нанокмполитов.	338
Блинова Е.А., Котикова А.И., Акеев А.В. Влияние метилирования промоторов генов регуляции апоптоза на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов у облученных людей	346
Мирненко Э.И. Содержание, состав и динамика фотосинтетических пигментов в водохранилищах р. Кальмиус Донецкой Народной Республики	353
Краткие сообщения	
Давидович Н.А., Кириенко Е.С. Некоторые физико-химические характеристики мареннин-подобного пигмента, синтезируемого морской диатомовой водорослью <i>Haslea karadagensis</i> (Bacillariophyta).	360
Мнения	
Хохлов А.Н. Антиоксиданты: полезные, вредные или нейтральные в плане влияния на старение и продолжительность жизни? Все зависит от обстоятельств	367
Указатель статей, опубликованных в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2024 г.	372

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 79 • No. 4 • 2024 • OCTOBER — DECEMBER

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Editorial

- Kirpichnikov M.P., Ilyina N.A., Akhaev D.N., Belyakova G.A.,
Osmolovskiy A.A. Concept of development of biological education
in the Russian Federation 253

Reviews

- Malakhov V.V., Ezhova O.V., Ekimova I.A., Gantsevich M.M. General patterns
of the ontogenesis of *Ambulacraria* 259
- Fetisova E.K., Vorobjeva N.V., Muntyan M.S. Multiple sclerosis. Some features
of pathology and prospects for therapy. Part 2 269
- Mironova T.V., Tahanovich A.D., Kadushkin A.G., Makarevich V.V.,
Shilovskiy I.P., Khaitov M.R. The role of immune response components
of the first and seventeenth types in the development of allergic diseases
of the respiratory system 280

Research articles

- Kupriyanova E.V., Manakhova K.A., Ezhova T.A. *PARG1* and *EXAI* interacting
genes are important regulators of autoimmunity in plants 287
- Alexandrov O.S., Romanov D.V. Study of structural features of 5S rDNA
non-transcribed spacers of *Citrus sinensis* and *C. reticulata* 298
- Gudkova V.R., Gvozdev D.A., Tsoraev G.V., Moysenovich A.M.,
Maksimov E.G. High-power LED-based light source for photosensitizer efficiency
assay against cell culture 306
- Sokolova I.B., Shuvaeva V.N. Dynamics of development of the systemic
inflammatory response and disruption of endothelium-dependent vasodilation
of cerebral arteries. 315
- Lobanova A.A., Korovina A.N., Koshkina D.O., Chernikova P.A.,
Feofanov A.V., Studitsky V.M., Nilov D.K., Maluchenko N.V.
Gel electrophoretic analysis of protein-DNA complexes to classify inhibitors
of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 322

© Moscow University Press,
“Lomonosov Biology Journal,” 2024

Varybok S.D., Onipchenko V.G., Gulov D.M., Elumeeva T.G. Functional plant traits and diversity of subalpine <i>Bromus variegatus</i> grasslands of the North-Western Caucasus	330
Repkova M.N., Zarytova V.F., Mazurkov O.Yu., Mazurkova N.A., Makarevich E.V., Filippova E.I., Nekrasov M.D., Kupryushkin M.S., Levina A.S. Effective <i>in vitro</i> inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by oligonucleotide-containing nanocomposites	338
Blinova E.A., Kotikova A.I., Akleyev A.V. Effect of gene promoter methylation of apoptosis regulation on the intensity of lymphocyte cell death in exposed people. . .	346
Myrnenko E.I. Content composition and dynamics of photosynthetic pigments in the reservoirs of the Kalmius River of the Donetsk People's Republic	353
Short communications	
Davidovich N.A., Kirienko E.S. Some physico-chemical characteristics of the marennine-like pigment synthesized by the marine diatom <i>Haslea karadagensis</i> (Bacillariophyta)	360
Opinion articles	
Khokhlov A.N. Antioxidants: Beneficial, harmful, or neutral in influence on aging and lifespan? It all depends on the circumstances	367
Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2024. . .	372

ОТ РЕДАКЦИИ

УДК 372.8+377.1+378.4



Концепция развития биологического образования в Российской Федерации

М.П. Кирпичников¹ , Н.А. Ильина² , Д.Н. Ахаев¹, Г.А. Белякова¹,
А.А. Осмоловский^{1,*}

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

²Псковский государственный университет, 180000, Россия, г. Псков, пл. Ленина, д. 2
*e-mail: aosmol@mail.ru

Разработан проект Концепции биологического образования, направленной на реализацию национальных целей Российской Федерации на период до 2030 г. и на перспективу до 2036 г. Концепция представляет собой систему взглядов на базовые принципы, цели, задачи и основные направления развития биологического образования в Российской Федерации. В проекте ставятся задачи: определить актуальность, приоритетность и проблемное поле биологического образования для экономического развития Российской Федерации; охарактеризовать основные цель и задачи, направления и инструментарий развития современного биологического образования; сформировать новшества концепции биологического образования.

Ключевые слова: биологическое образование, концепция, приоритеты, проблемы, направления и инструменты, новшества

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-6

Введение

Современная биология — динамично развивающаяся наука. Специалисты-биологи обеспечивают развитие медицины, сельского хозяйства, экономики, решают задачи в таких областях, как археология, юриспруденция, охрана окружающей среды [1–3]. Деятельность биологов направлена на улучшение качества жизни населения, продовольственную и биобезопасность, укрепление технологического суверенитета страны. Ввиду тесных связей с другими науками — физикой, химией, математикой, информатикой — в биологию неизбежно входят новые, в том числе высокопроизводительные, методы исследований [1, 3]. Мировая практика показывает, что за последние 25 лет существенно поменялись тренды развития биологии, области ее приложений и, соответственно, структура рынка труда [4, 5]. Все это приводит к неизбежной трансформации содержания биологического образования на разных уровнях (от школы до университета), необходимости усиления биологической грамотности населения и популяризации достижений наук о жизни [6, 7]. Возрастает роль биологического образования и ответственности за подготовку высококлассных, современных и востребованных специалистов-биологов, что требует переосмысления существующих практик такой

подготовки на всех уровнях образования, их анализа и систематизации в виде вектора дальнейшего развития биологического образования в стране. Для объединения и закрепления идей, направленных на решение выявленных проблем, предложена настоящая Концепция развития биологического образования. Ключевым моментом концепции является идея «бесшовности» — поступательного развития биологического образования (подготовки) на всех уровнях образования — от школы до подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре. Концепция включает предпосылки и разработки улучшения школьного биологического образования [8–11], положения, закрепленные действующими образовательными стандартами для всех уровней образования, а также выводы, сделанные на основе анализа существующего положения дел в образовательной среде России, основанные на многолетнем опыте преподавания биологии в школах и биологических дисциплин в организациях высшего образования, программах подготовки талантливых школьников и переподготовки школьных учителей биологии. Она изложена в виде тезисов, представленных ниже.

Концепция представляет собой систему взглядов на базовые принципы, цели, задачи и основные направления развития биологического

образования в Российской Федерации. Она включает описание актуальности и приоритетности биологического образования для экономики, проблемы, задачи, направления реализации, инструментов и новшества развития современного биологического образования.

Актуальность и приоритетность биологического образования для экономического развития Российской Федерации

Значение биологии и биологического образования в России и в современном мире определяется следующими аксиомами.

Биологические знания — основа биологического образования. Последние десятилетия показали, что науки о жизни — самая динамично развивающаяся область знаний. Качественное биологическое образование необходимо каждому гражданину страны для его успешной жизни в современном обществе. Положение нашей страны в современном мире, эффективность использования природных ресурсов, развитие экономики, охраны окружающей среды, создание современных биотехнологий и медицинских технологий, а также биобезопасность во многом зависят от уровня развития биологической науки и биологических знаний, умений и навыков всего населения, от эффективного использования современных биологических методов.

Развитие биологии определяется созданием новых методов и инструментов исследования. Биология сегодня — область знаний, развитие которых определяют новые методы и технологии. Многие инструменты физики, химии, математики и компьютерных наук в современном мире направлены на решение биологических задач. С другой стороны, без биологического знания и биотехнологий невозможно представить эффективное развитие многих прикладных направлений и дисциплин — от современной доказательной медицины и сельского хозяйства до археологии, экономики и юриспруденции. Развитие биологического образования и наук о жизни, обеспечивающее прорыв в таких наукоемких стратегических направлениях, как биотехнологии, генетические технологии, структурная биология, синтетическая и инженерная биология, экологический мониторинг, биомедицина, биобезопасность страны, будет способствовать улучшению положения и повышению престижа России в мире.

Проблемное поле биологического образования

В процессе научно-технологического развития и социальных изменений усугубились проблемы сопутствующего развития биологического образования и наук о жизни. Очень важно, чтобы биологическое образование приближалось к актуальному уровню биологической науки. В предлагаемом проекте концепции выделены существующие проблемы биологического образования в стране.

Проблемы мотивационного характера

1. Информированность обучающихся и общества. Низкая учебная мотивация обучающихся к изучению биологии обусловлена быстрым ростом объема научных знаний; недостаточным вниманием к лабораторным и практическим работам, а также к проектной деятельности на уровнях основного общего и среднего общего образования; недостаточной популяризацией биологических знаний в обществе.

2. Выбор профессии. Реализация карьерных потребностей выпускников биологических специальностей все еще остается проблемой. Причина — недостаточный престиж биологических профессий. Зачастую обучающиеся старших классов и их родители не понимают, кто такие биологи и где в дальнейшем они смогут работать, выбрав это направление для обучения в вузах, и отдают предпочтение более практико-ориентированным, по их мнению, направлениям, таким как медицина, фармация, пищевое производство.

3. Соответствие методики преподавания специфике (сущности) учебной дисциплины/образовательной программы. Необходимо оптимизировать содержание образовательных программ основного общего и среднего общего образования, предусмотрев усиление их практико-ориентированности, включение новых научных открытий и синхронизацию с результатами, проверяемыми в рамках государственной итоговой аттестации.

Проблемы содержательного характера

Отбор содержания разделов учебного предмета «Биология» в программах основного общего, среднего общего и среднего профессионального образования, а также при изучении ряда биологических дисциплин в организациях высшего образования остается дискуссионным. В содержании биологических знаний определены следующие проблемы:

1) баланс объема теоретических и практических знаний;

2) сопоставление объема, разделов, последовательности освоения биологических знаний, приобретения умений и навыков на каждом уровне образования — от дошкольного до профессионального;

3) определение модели получения углубленного практико-ориентированного биологического знания в системе основного общего и среднего образования.

Проблема подготовки будущих специалистов в области биологии

Эта проблема связана с отсутствием постоянной актуализации содержания профессиональных образовательных программ, а также с несистемным и неverifiedицированным содержанием биологических знаний учебного материала.

Кадровые проблемы

Включают уровень и качество биологических знаний учителей и преподавателей; инфраструктуру и ресурсную обеспеченность преподавания биологических дисциплин; модель подготовки учителя-предметника (учителя биологии) и его сопровождение в профессии.

Цель и задачи, направления и инструментарий развития современного биологического образования

Цель настоящей Концепции — вывести российское биологическое образование на лидирующие позиции в мире. Биологическое образование в Российской Федерации должно способствовать формированию у граждан представлений о фундаментальных принципах функционирования живых систем и взаимосвязи человека с другими элементами биосферы, что определит подготовку специалистов, обеспечивающих технологический суверенитет страны в сферах реального сектора экономики, социальной сфере, вопросах биобезопасности.

Задачами развития биологического образования в Российской Федерации являются:

- модернизация содержания учебных программ биологического образования на всех уровнях (с обеспечением их преемственности) с учетом потребностей обучающихся, общества и государства;
- гарантированная подготовка на уровне высшего профессионального образования высококвалифицированных специалистов в области преподавания биологии;
- обеспечение наличия общедоступных информационных ресурсов, необходимых для реализации учебных программ биологического образования;
- формирование стандарта инфраструктуры — требований к оснащенности кабинетов биологии (лабораторное оборудование, расходные материалы, наглядные пособия) образовательных организаций;
- повышение качества работы преподавателей биологии (от педагогических работников общеобразовательных учреждений до научно-педагогических работников образовательных организаций высшего образования), усиление механизмов их материальной и социальной поддержки, обеспечение им возможности обращения к лучшим образцам российского и мирового биологического образования, создания и реализации собственных педагогических подходов и авторских программ;
- поддержка лидеров биологического образования (организаций, отдельных педагогов и ученых, а также структур, формирующихся вокруг лидеров), выявление новых активных лидеров;
- использование достижений современной биологии при подготовке кадров, усиление связи с практикой, устранение барьеров между школой и ВУЗом;

— формирование на уровне основного общего и среднего общего образования системы выявления и устранения пробелов в базовых биологических знаниях у обучающихся согласно федеральным стандартам;

— формирование у обучающихся универсальных учебных познавательных действий при изучении биологии (базовых логических, исследовательских действий и навыков работы с информацией);

— формирование индивидуальной траектории для обучающихся с высокой мотивацией и выдающимися способностями;

— утверждение у обучающихся современной научной картины мира;

— формирование умения использовать знания биологии для грамотных действий в отношении объектов живой природы и решения разных жизненных проблем;

— становление функциональной грамотности, развитие умения объяснять явления окружающего мира на основе знаний и опыта;

— популяризация биологических знаний, в том числе биоразнообразия, охраны окружающей среды и экологической культуры.

Основные направления реализации Концепции

1. Дошкольное и начальное общее образование.

Система учебных программ биологического образования в дошкольном и начальном общем образовании (в том числе при участии семьи) должна обеспечить:

— в дошкольном образовании — условия для формирования интереса и развития навыков наблюдения за живыми объектами, первичных биологических представлений, используемых в повседневной жизни;

— в начальном общем образовании — широкий спектр связанной с природой и природными объектами активности (занятий) обучающихся как на уроках, так и во внеурочной деятельности, материальные, информационные и кадровые условия для развития у обучающихся основ биологического познания и поискового метода, включая навыки постановки и интерпретации биологических опытов.

2. Основное общее и среднее общее образование.

Биологическое образование на данном уровне образования должно:

— сформировать устойчивую мотивацию к изучению наук о жизни;

— обеспечить каждому обучающемуся необходимый для дальнейшей успешной жизни в обществе уровень биологической грамотности;

— создать условия для реализации исследовательской и проектной деятельности обучающихся по биологическим дисциплинам;

— обеспечить необходимое стране число выпускников, биологическая подготовка которых

достаточна для продолжения профессионального образования;

— активно внедрять в повседневную практику всероссийскую инициативу «Научное волонтерство» (вовлечение граждан в масштабные исследовательские проекты, в том числе по сбору и анализу научных данных).

3. Высшее и профессиональное образование.

Система профессионального образования должна обеспечивать необходимый уровень биологической подготовки кадров для нужд биологии, экономики, научно-технического прогресса, безопасности и медицины. Студенты, изучающие биологию, должны владеть необходимыми знаниями и навыками в области математики, информационных технологий, физики, химии, а преподаватели этих дисциплин должны участвовать в биологических исследованиях и проектах.

Преподавателям биологических подразделений профессиональных образовательных организаций и образовательных организаций высшего образования необходимо вести признаваемые профессиональным сообществом фундаментальные и прикладные исследования, а их студенты должны уделять значительно больше времени решению творческих учебных и исследовательских задач.

Преподаватели биологических дисциплин педагогических вузов должны иметь полноценную возможность работы с обучающимися, участвовать в разработке аттестационных материалов, учебных пособий для школ, участвовать в проведении научных исследований и проектах научного волонтерства. Студентам (прежде всего — готовящимся стать педагогическими работниками в образовательных организациях) необходимо дать возможность решать биологические задачи в существенно большем объеме, чем сегодня, проходить практику в школе.

4. Дополнительное образование.

С учетом динамики развития биологии роль дополнительного образования существенно возрастает. Программы дополнительного образования направлены на актуализацию знаний в отдельной области биологии, овладение новыми методами и приемами. Такие программы должны быть на самом острие развития науки, позволяя по их окончании решать задачи прикладного характера как в области науки, так и для индустрии. Они должны быть адаптированы для разных возрастных групп, групп с разным уровнем образования. Особая необходимость в таких программах существует для учителей биологии, работающих в общеобразовательных организациях.

5. Биологическое просвещение и популяризация биологии.

Данное направление работы нацелено на массовость и сквозной характер работы с населением. Именно включение всех целевых групп по возрасту, профессиональному ориентиру и отрасли

экономики позволит сформировать единую политику в развитии и увеличении ценности биологического образования в Российской Федерации. Предусматривается реализовать следующие инструменты и форматы работы:

— обеспечение государственной поддержки доступности изучения биологии для всех возрастных групп населения;

— создание общественной атмосферы позитивного отношения к достижениям биологической науки и работе в этой области, понимания важности биологического образования для будущего страны, формирование гордости за достижения российских биологов;

— обеспечение непрерывной поддержки и повышения уровня биологических знаний для удовлетворения любознательности человека, его общекультурных потребностей, приобретение знаний и навыков, применяемых в повседневной жизни и профессиональной деятельности.

— развитие биотуризма как перспективной формы внутреннего туризма и просвещения населения в области биологии.

Основные новшества

Концепции биологического образования

1. Формирование единой «бесшовной» образовательной среды «дошкольное и школьное образование — среднее специальное образование — высшее образование — индустриальный партнер».

2. Обеспечение технологического суверенитета России посредством развития стратегических направлений реальных секторов экономики страны (биотехнология и медицина, биофармацевтика, пищевые и промышленные технологии, сельское хозяйство, генетические технологии, инженерная биология, экологический мониторинг, управление живыми системами).

3. Обеспечение биологической безопасности России.

4. Повышение качества подготовки преподавателей биологии в школах и профессорско-преподавательского состава в педагогических и сельскохозяйственных вузах.

5. Формирование общедоступных цифровых информационных ресурсов, необходимых для реализации учебных программ биологического образования, инструментов деятельности обучающихся и педагогов, применение современных технологий образовательного процесса.

6. Создание мер поддержки лидеров биологического образования (организаций и отдельных преподавателей), развитие наставничества в проектных работах школьников.

7. Создание стандартов инфраструктуры для практических/лабораторных занятий и исследовательской деятельности учащихся школ и центров дополнительного образования, учреждений среднего профессионального образования и вузов.

8. Формирование эффективной системы выявления и обеспечения индивидуальной образовательной траектории для талантливой молодежи.

9. Популяризация роли биологического знания и биологического образования в общественной жизни.

10. Формирование для государства нового источника валютной выручки от экспорта российской модели биологического образования в дружественные страны.

Заключение

1. Биологическое образование должно обеспечивать опережающее развитие общества и государства, в связи с чем особая роль отводится контекст-

ному обучению — максимальному включению в программы обучения элементов будущей профессиональной деятельности.

2. Выпускники должны обладать должной подготовкой, позволяющей в короткие сроки освоить уровень развития наук о жизни и быть мобильными при смене видов и направлений деятельности в биологии.

3. Эффективными инструментами Концепции развития биологического образования должны стать популяризация биологического знания, повышение престижа профессий учителя биологии, а также стандарта требований к инфраструктуре, кадровой политике и содержанию учебных и научных материалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aikens M.L. Meeting the needs of a changing landscape: Advances and challenges in undergraduate biology education. *Bull. Math. Biol.* 2020;82(5):60.

2. Суматохин С.В. *Биологическое образование на рубеже XX–XXI веков*. Изд-во «Школьная пресса»; 2021. 416 с.

3. Tibell L.A.E., Rundgren C.-J. Educational challenges of molecular life science: characteristics and implications for education and research. *CBE Life Sci. Educ.* 2010;9(1):25–33.

4. Labov J.B., Reid A.H., Yamamoto K.R. Integrated biology and undergraduate science education: A new biology education for the twenty-first century? *CBE Life Sci. Educ.* 2010;9(1):10–16.

5. Abdullah K.H. Publication trends in biology education: A bibliometric review of 63 year. *J. Turk. Sci. Educ.* 2022;19(2):465–480.

6. Пивоварова Л.В. Биологическое образование в меняющихся социокультурных условиях. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 20: Педагогическое образование*. 2021;1:76–93.

7. Пивоварова Л.В., Корженевская Т.Г., Гусев М.В. Роль науки и образования в формировании биологической грамотности. *Вестн. РАН. РАН.* 2006;76(1):30–37.

8. Суматохин С.В. Естественно-научная грамотность как цель развития школьного биологического образования. *Биология в школе*. 2019;(1):15–22.

9. Суматохин С.В., Николенко Т.Г. Биомедицина и школьное биологическое образование. *Биология в школе*. 2020;(1):25–27.

10. Теремов А.В., Годин В.Н., Рохлов В.С., Мансурова С.Е. О содержании и структуре биологического образования в основной школе. *Биология в школе*. 2021;(1):15–29.

11. Пасечник В.В., Степанова Л.А. Состояние и проблемы школьного биологического образования. *Пед. обр. наука*. 2018;(4):127–131.

Поступила в редакцию 13.11.2024

После доработки 09.12.2024

Принята в печать 22.12.2024

EDITORIAL

Concept of development of biological education in the Russian Federation

M.P. Kirpichnikov¹ , N.A. Ilyina² , D.N. Akhaev¹, G.A. Belyakova¹, A.A. Osmolovskiy^{1, *} 

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

²*Pskov State University, pl. Lenina, 2, Pskov, 180000, Russia*

*e-mail: aosmol@mail.ru

A draft Concept of Biological Education has been developed, aimed at achieving the national goals of the Russian Federation for the period up to 2030 and for the future up to 2036. The concept is a general view of the basic principles, goals, objectives and main directions of development of biological education in the Russian Federation. The project sets the following tasks: to determine the relevance, priority and problematic nature of the field of biological education for the economic development of the Russian Federation; to characterize the main goals and objectives, directions and tools for the development of modern biological education; present novelties of the concept of biological education.

Keywords: *biological education, concept, priorities, problems, directions and tools, innovations*

Сведения об авторах

Кирпичников Михаил Петрович — докт. биол. наук, академик РАН, декан биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-3849>

Ильина Наталья Анатольевна — докт. биол. наук, проф., ректор ПсковГУ. Тел.: 8-8112-201-699, e-mail: n-ilina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-002-3724-4661>

Ахаев Дмитрий Николаевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зам. декана биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-36; e-mail: ahaeff@mail.ru

Белякова Галина Алексеевна — канд. биол. наук, доц., зам. декана, доцент биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-49; e-mail: adm-odo@yandex.ru

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц., зам. декана биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-57, e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

ОБЗОР



УДК 575.86:593.9

Общие закономерности онтогенеза *Ambulacraria*

В.В. Малахов , О.В. Ежова , И.А. Екимова , М.М. Ганцевич*

*Кафедра зоологии беспозвоночных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: mgantsevich@gmail.com*

Предполагается, что жизненный цикл с участием двух личинок (планктотрофной и резервотрофной) является синапоморфией *Ambulacraria*. Планктотрофные личинки имеют сложный ресничный шнур и используют «up-stream»-фильтрацию для питания. Планктотрофные личинки претерпевают метаморфоз и превращаются в непитающихся личинок с полными или неполными ресничными кольцами. Эти личинки используют не желток, а запасы, накопленные на предыдущей планктотрофной стадии, поэтому их можно назвать резервотрофными. Среди иглокожих голотурии имеют жизненный цикл, который может рассматриваться как плезиоморфный. Он включает планктотрофную личинку (аурикулярию) и резервотрофную личинку (долиолярию). Большинство иглокожих потеряли резервотрофных личинок, хотя рудиментарные долиолярии известны у некоторых морских ежей и офиур. У большинства морских лилий есть только личинки долиолярии, хотя у стебельчатых морских лилий есть аурикулярии, за которыми следуют долиолярии, но обе личинки лецитотрофны. У кишечнодышащих *Spengelidae* и *Ptychoderidae* есть планктотрофные торнарии, за которыми следуют резервотрофные личинки Агассица. Виды семейства *Naegamiidae* утратили торнарий, но сохранили лецитотрофных личинок Агассица. Гигантские планктотрофные личинки были обнаружены как у иглокожих, так и у полухордовых. Глубоководная голотурия *Protankyra brychia* имеет гигантскую личинку, известную под названием *Auricularia nudibranchiata*. Возможно, что гигантская торнария, известная под названием *Planctosphaera pelagica*, является личинкой какого-то вида глубоководных кишечнодышащих.

Ключевые слова: *Ambulacraria*, аурикулярия, долиолярия, торнария, личинка Агассица, *Planctosphaera*, эволюция

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-7

Введение

В 1849 г. немецкий зоолог Й. Мюллер [1] обнаружил среди организмов планктона Средиземного моря таинственную личинку, которую назвал торнарией. По строению ресничных шнуров эта личинка выглядела настолько похожей на бипиннарию морских звезд, что исследователи середины XIX в. были уверены в том, что торнария – эта одна из разновидностей личинок морских звезд [1–2]. Только через 20 лет российский эмбриолог И.И. Мечников [3] установил, что торнария, которую ранее принимали за личинку иглокожих, на самом деле является стадией развития полухордовых. Позднее И.И. Мечников [4] обосновал таксон *Ambulacraria*, в состав которого вошли *Echinodermata* и *Hemichordata*. Открытие И.И. Мечникова сыграло решающую роль в решении вопроса о положении *Hemichordata* в системе животного царства, однако предложение о создании таксона *Ambulacraria* не было востребовано более ста лет. Современные исследования в области молекулярной филогенетики подтвердили справед-

ливость предсказания И.И. Мечникова о близком родстве *Echinodermata* и *Hemichordata*. В начале XXI в. таксон *Ambulacraria* Metschnikoff, 1870 вновь появился на страницах научных публикаций [5–9].

В настоящей работе мы попытаемся реконструировать особенности личиночного развития общего предка *Ambulacraria*.

Развитие голотурий – плезиоморфный вариант онтогенеза иглокожих

Развитие иглокожих характеризуется большим разнообразием личиночных форм. Для морских звезд, морских ежей и офиур типичным является развитие с долго плавающими планктотрофными личинками, которые в конце своей пелагической жизни подвергаются метаморфозу, хотя в каждой из этих групп имеются формы с непитающимися лецитотрофными личинками, с прямым развитием и даже с живорождением. В жизненном цикле морских лилий имеются только короткоживущие лецитотрофные личинки. Только у голотурий в жизненном цикле одного и того же вида имеются

и планктотрофные личинки, и непитающиеся личиночные формы. Рассмотрим поэтому личиночное развитие голотурий подробно.

Первой личиночной стадией голотурий являются бластулы, которые активно плавают в толще воды благодаря жгутикам, имеющимся на всех клетках [10–14]. В процессе гастрюляции у голотурий имеет место выселение двух популяций мезенхимных клеток. Клетки первичной мезенхимы выселяются в начале гастрюляции и формируют два неодинаковых по размерам (левое крупнее правого) скопления на заднем конце личинки справа и слева от бластопора. Впоследствии внутри этих скоплений формируются два диссимметричных известковых склерита (левый крупнее правого), которые сохраняются в течение всего развития, что позволяет проследить преемственность сторон тела личинки и ювенильной формы [15]. Впервые диссимметричные склериты отметил И.И. Мечников [16], но они остались незамеченными многими последующими исследователями. Клетки вторичной мезенхимы выселяются с вершины архентерона в конце гастрюляции и рассеиваются по всему бластоцелю. Два поколения мезенхимных клеток помимо голотурий характерны для морских ежей, и в обеих группах их дифференциация контролируется сходными молекулярно-генетическими механизмами [17].

В конце гастрюляции на дорсальной стороне архентерона формируется выпячивание, представляющее собой зачаток целома. Он соединяется с внешней средой каналом на дорсальной стороне, тогда как на вентральной стороне формируется углубление, на дне которого открывается рот. Отверстие бластопора становится анальным отверстием. Из-за усиленного роста дорсальной стороны анус смещается на вентральную сторону. Жгутиковые клетки эктодермы по краю околоротового углубления формируют ресничный шнур с более густым расположением жгутиков, чем на других участках эпидермиса. Ресничный шнур окаймляет адоральное ресничное поле, в центре которого на дне глубокой вентральной впадины располагается рот. Впоследствии ресничный шнур формирует ушковидные петли, из-за которых в свое время Й. Мюллер [18] назвал личинок голотурий аурикуляриями. У личинок голотурий преоральная и посторальная части ресничного шнура переходят одна в другую на переднем конце личинки (рис. 1А). Зачаток целома разрастается в направлении заднего конца личинки, огибает кишку, переходит на правую сторону тела и разделяется на три отдела: левый гидроцель, который в течение всего развития остается связанным с внешней средой через гидропор, и замкнутые левый и правый соматоцели (рис. 1А).

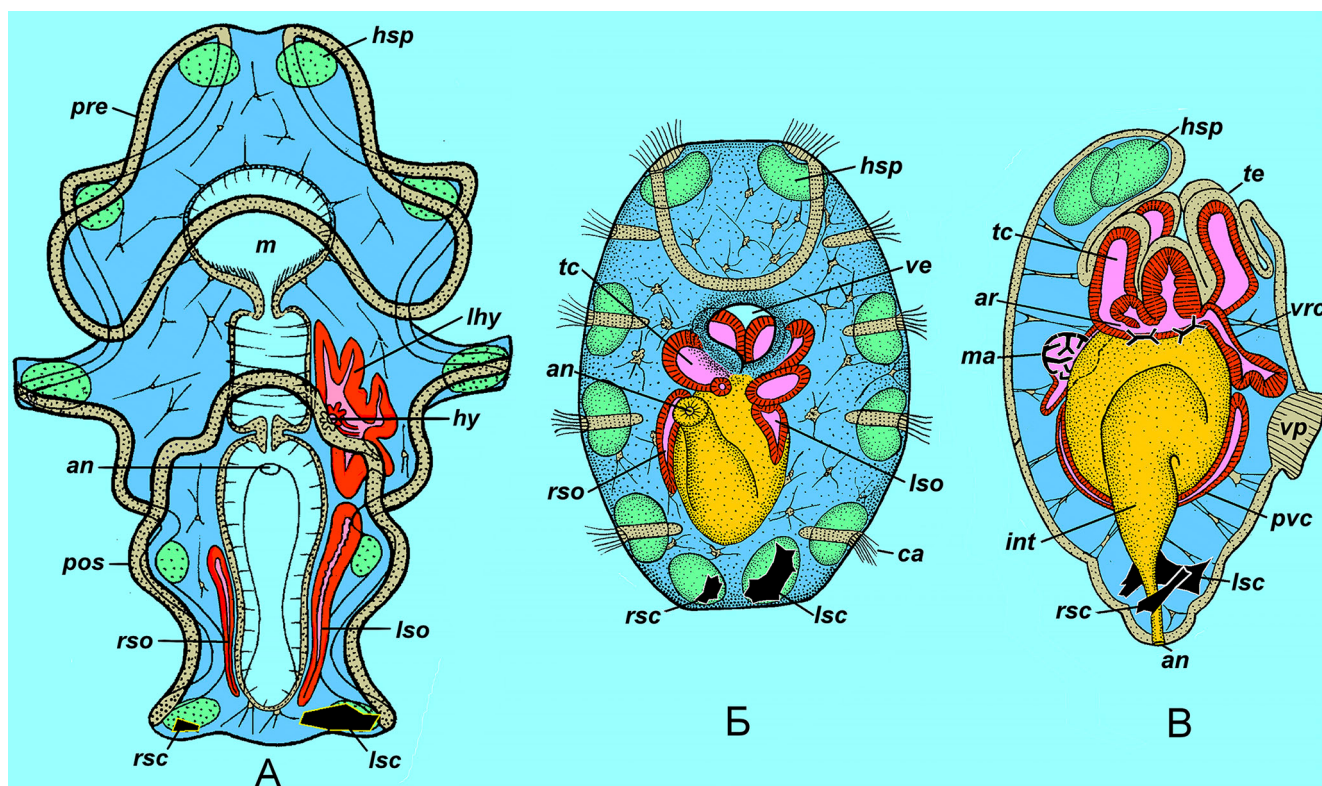


Рис. 1. Поздняя аурикулярия (А), долиолярия (Б) и пентактула (В) голотурии *Apostichopus japonicus*. Обозначения: an — анус, ar — амбулакральное кольцо, ca — ресничные дуги, hsp — гиалиновые сферы, hy — гидропор, int — кишечник, lhy — левый гидроцель, lsc — левый склерит, lso — левый соматоцель, m — рот, ma — madreporная ампула, pos — посторальная часть ресничного шнура, pre — преоральная часть ресничного шнура, pvc — перивисцеральный целом, rso — правый соматоцель, rsc — правый склерит, tc — щупальцевый целом, te — щупальца, ve — вестибулум, vp — вентральная амбулакральная ножка, vrc — вентральный радиальный канал. А, Б — вид с вентральной стороны, В — вид справа. По: Малахов, Черкасова. 1991, с изменениями. Отделы целома показаны красным цветом.

Ресничный шнур используется аурикуляриями как для локомоции, так и для питания одноклеточными планктонными водорослями с использованием механизма «up-stream»-фильтрации [19]. При этом жгутики соседних лент ресничного шнура работают в противоположных направлениях. Пищевые частицы, приносимые потоками воды, отбрасываются реверсивным ударом жгутиков на адоральное ресничное поле между лентами ресничного шнура и транспортируются к ротовому отверстию [19–20].

Продолжительность стадии аурикулярии у Stichopodidae составляет 10–30 сут [15, 21–24]. К концу планктотрофного этапа развития аурикулярии Stichopodidae имеют размеры 0,7–1,1 мм [13, 14, 21, 24, 25]. Полностью развитые аурикулярии *Synapta digitata* достигают размера 1,7 мм [26]. Хун [27] обнаружил в планктоне у побережья Канарских островов очень крупных аурикулярий (до 6 мм) с причудливым узором ресничного шнура с многочисленными ушковидными петлями (рис. 2А). Поскольку взрослые представители этого вида не были известны, Хун [27] дал личинкам предварительное название *Auricularia nudibranchiata*. Впоследствии они были найдены в различных районах Атлантического и Тихого океанов [28, 29]. Наиболее крупные из личинок *A. nudibranchiata* достигали размера 15 мм [28]. Загадка гигантских аурикулярий была разрешена только более чем через 100 лет после их обнаружения. Оказалось, что гигантские личинки принадлежат глубоководной голотурии *Protankyra brychia* из семейства Synaptidae, обитающей в батии и абиссали в Атлантическом и Тихом океанах [30]. Крупные размеры, которые достигаются планктотрофными аурикуляриями *P. brychia*, позволяют предполагать большую продолжительность их жизни в толще воды. Это позволяет личинкам преодолевать огромные расстояния, чем и объясняется космополитический ареал *P. brychia* ([30], рис. 10).

К концу планктотрофного этапа развития в бластоцеле аурикулярий появляются прозрачные сферические образования – так называемые эластические шары, или гиалиновые сферы (рис. 1А) [14, 18, 24, 26, 31–33]. Они содержат нейтральные липиды, которые используются как энергетический ресурс для последующего развития [34].

Следующая личиночная стадия в развитии голотурий – долиолярия. При формировании долиолярии размеры личинки уменьшаются в 2–2,5 раза, а форма тела становится бочонковидной (рис. 1Б). Непрерывный ресничный шнур аурикулярии при этом распадается на пять пар неполных ресничных дуг [13, 15, 16, 24, 26, 33, 35, 36]. На вентральной стороне формируется вестибулум, на дне которого находится рот, тогда как анус смещается на правую сторону тела (рис. 1Б). На дне вестибулума вокруг рта формируются пять личиночных

щупалец. Долиолярия плавает в придонном слое воды и не питается, но назвать эту стадию лецитотрофной было бы неправильно. Источником питания долиолярии служит не желток яйцеклетки, а резервы, накопленные планктотрофной аурикулярией. Таким образом, долиолярия – это особая личиночная стадия, которую можно назвать резервотрофная личинка.

После относительно короткого периода плавания в придонном слое воды долиолярия теряет ресничные кольца и прodelывает второй этап метаморфоза – превращение долиолярии в пентактулу (рис. 1В). Анус закрывается, кишечник формирует характерную петлю, после чего анус заново открывается на заднем конце тела между двумя диссимметричными склеритами (рис. 1В). На месте гидropora формируется подкожная madreporовая ампула, стенки которой инкрустированы скелетными иглами (рис. 1В). На вентральной стороне пентактулы формируется первая амбулакральная ножка. Мидвентральный канал амбулакральной системы прорастает дальше других, формируя ампулу первой амбулакральной ножки. Левый и правый соматоцели объединяются, формируя общую полость тела (рис. 1В). Позднее на поверхности пентактулы закладываются скелетные пластинки, так что все тело, за исключением щупалец и амбулакральной ножки, оказывается закованным в ажурный панцирь. Полностью развитые пентактулы передвигаются, попеременно прикрепляясь к субстрату околоротовыми щупальцами и единственной амбулакральной ножкой. Вентральная сторона пентактулы соответствует вентральной стороне аурикулярии, что легко установить благодаря наличию диссимметричных склеритов, которые закладываются по окончании гастрюляции и сохраняются в течение всего развития.

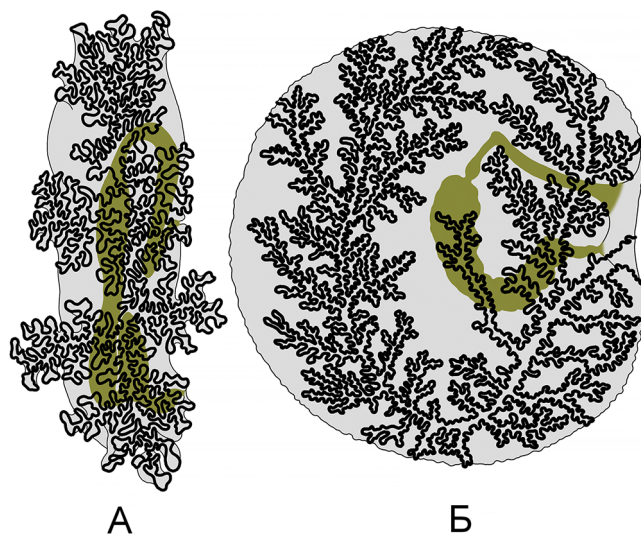


Рис. 2. Гигантские личинки Ambulacraria. А – *Auricularia nudibranchiata* (по: Chun, 1896), Б – *Planctosphaera pelagica* (по: Horst, 1936).

Соображения по поводу эволюции личиночного развития иглокожих

В пределах типа иглокожих имеется два основных типа личинок: планктотрофная личинка со сложно устроенным ресничным шнуром и лецитотрофная бочонковидная личинка с ресничными кольцами [37–41]. Наличие у голотурий двух личиночных стадий — питающейся аурикулярии и непитающейся долиолярии — следует рассматривать как плезиоморфную черту онтогенеза не только голотурий, но и иглокожих в целом [37–40].

У голотурий есть две тенденции в эволюции жизненного цикла. Одна из них — редукция планктотрофной аурикулярии. В этом случае долиолярия становится настоящей лецитотрофной личинкой, поскольку использует в качестве источника энергии только желток яйцеклетки. Лецитотрофные долиолярии описаны у многих видов голотурий [10, 42–45]. У некоторых голотурий вместо долиолярии формируется еще более упрощенная лецитотрофная личинка — вителлярия, у которой нет даже ресничных колец, а имеется равномерный ресничный покров [46–49]. Другая тенденция — гипертрофия планктотрофной аурикулярии и редукция лецитотрофной долиолярии, выраженная у *Protankyra brychia*, гигантская планктотрофная личинка которой превращается в ювенильную особь, минуя стадию резервотрофной долиолярии [50].

В жизненном цикле морских звезд, морских ежей и офиур, как правило, имеется только планктотрофная личинка с ресничными шнурами, которая в процессе метаморфоза дает начало донной ювенильной особи. Тем не менее, есть основания считать, что такой тип жизненного цикла сформировался из более сложного жизненного цикла, в котором присутствовали как планктотрофная личинка с ресничными шнурами, так и резервотрофная личинка с ресничными кольцами. В развитии морских ежей *Mellita quinquiesperforata* (= *Mellita testudinata*) с типичным планктотрофным плютеусом во время метаморфоза формируется стадия с несколькими ресничными кольцами [51]. Это можно рассматривать как свидетельство существования у предков морских ежей стадии резервотрофной долиолярии [38–40]. В развитии некоторых офиур ресничные шнуры офиоплютеуса во время метаморфоза также преобразуются в ресничные кольца [51]. У *Ophioderma brevispinum* типичный планктотрофный офиоплютеус редуцирован, зато имеется бочонковидная лецитотрофная личинка с четырьмя ресничными кольцами [51, 52].

Долгое время считалось, что морские лилии имеют только лецитотрофную долиолярию с четырьмя или пятью ресничными кольцами [53–56]. Однако, как оказалось, у примитивных стебельчатых морских лилий в жизненном цикле последовательно сменяют друг друга две личиночные

формы [57]. Первая — аурикулярия, строение ресничного шнура которой сходно с таковым у аурикулярий голотурий (рис. 3). Ресничный шнур аурикулярии морских лилий распадается на отдельные отрезки, которые дают начало неполным ресничным кольцам долиолярии. В отличие от голотурий и аурикулярии, и долиолярия стебельчатых морских лилий — лецитотрофные личинки. Наличие двух личиночных форм у стебельчатых морских лилий позволяет предполагать, что предки морских лилий имели жизненный цикл, сходный с таковым голотурий, в котором существовала планктотрофная аурикулярия и резервотрофная долиолярия.

Жизненный цикл кишечнодышащих с планктотрофными личинками — плезиоморфный вариант развития Hemichordata

У представителей класса Enteropneusta стадии бластулы, гастролы и начальные стадии обособления целомической мезодермы протекают под оболочками яйца. Однако уже на стадии гастролы эмбрион начинает вращаться внутри яйцевых оболочек благодаря биению жгутиков, которые несут клетки эктодермы [58–62]. Раннее появление жгутиков позволяет предполагать, что у предков Enteropneusta зародыш покидал оболочки яйца уже на стадии бластулы, как это имеет место у многих иглокожих. Таким образом, по сравнению с иглокожими, у Enteropneusta с планктотрофными личинками имеет место некоторая эмбрионизация ранних стадий развития.

Гастрюляция у Enteropneusta протекает путем инвагинации. Еще до конца гастрюляции на вершине архентерона формируется выпячивание — левый передний целом (= левый протоцель), который открывается порой на дорсальной стороне (рис. 4А). Впоследствии на месте blastopora формируется анус, но, в отличие от личинок иглокожих, у личинок кишечнодышащих анус остается на заднем конце личинки (рис. 4А).

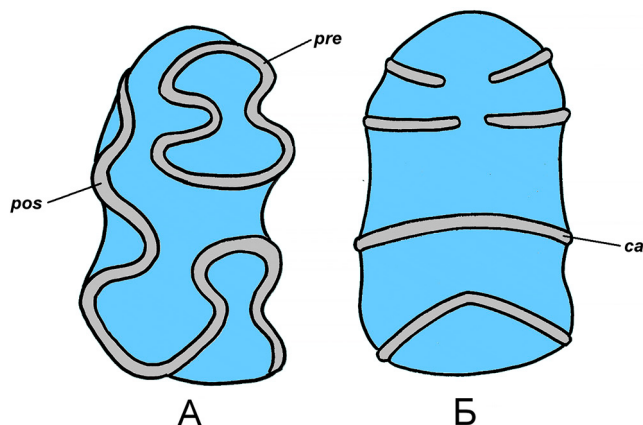


Рис. 3. Аурикулярия (А) и долиолярия (Б) стебельчатой морской лилии *Metacrinus rotundus*. Обозначения: са — ресничные дуги, pos — посторальная часть ресничного шнура, pre — преоральная часть ресничного шнура. Оригинальные рисунки по фотографиям из статьи Nacano et al., 2003.

Ресничный аппарат планктотрофной личинки Enteropneusta – торнарии – сохраняет все основные компоненты ресничного вооружения личинок Bilateria, в состав которого входят адоральное ресничное поле, окаймленное ресничными шнурами, нейротрох и телотрох [63–64]. Ресничный шнур торнарии подразделяется на преоральную и посторальную части, соединяющиеся в районе апикального чувствительного органа (рис. 4А). У молодых торнарий хорошо выражен нейротрох, который проходит по средней линии вентральной стороны и соединяет посторальную часть ресничного шнура и периаанальное ресничное кольцо – телотрох [58, 65–69]. Последний закладывается как кольцо простых ресничек (не синцилий) вокруг ануса. Впереди от телотроха формируется еще одно ресничное кольцо, образованное сложными ресничками (синцилиями), которое Нильсен и Хай-Шмидт [69] назвали опистотрох (рис. 4А). Он хорошо заметен, и его изображали все исследователи, изучавшие развитие Enteropneusta, обозначая как телотрох. Впрочем, на рисунках И.И. Мечникова [3] и других внимательных наблюдателей [70–73] изображены оба кольца – мощный опистотрох и тонкий телотрох. После формирования описто-

троха, нейротрох пересекает его и тянется до тонкого периаанального ресничного кольца [67]. Это подтверждает гомологию периаанального ресничного кольца (а не опистотроха) телотроху личинок других Bilateria.

Адоральное ресничное поле разрастается, формируя протяженные извилистые пищевые бороздки, окаймленные ресничными шнурами (рис. 4А). Адоральное ресничное поле крупных торнарий – личинок представителей семейства Ptychoderidae – образует окаймленные ресничным шнуром регулярные выросты – своего рода щупальца (рис. 4Б). Это сильно увеличивает площадь поверхности адорального ресничного поля, которое используется для сбора пищевых частиц. Механизм добывания пищи у торнарий – это типичная «up-stream»-фильтрация, идентичная таковой у личинок иглокожих [19, 74].

Полностью развитые щупальцевые торнарии (так называемая стадия Крона) у некоторых видов могут достигать размера 9 мм [2, 75]. Как показано ранее [76], период планктотрофного развития длится от 3–4 нед. у *Balanoglossus clavigerus* до 4–5 мес. у *Ptychodera flava* [69]. По окончании периода планктотрофного развития личинка

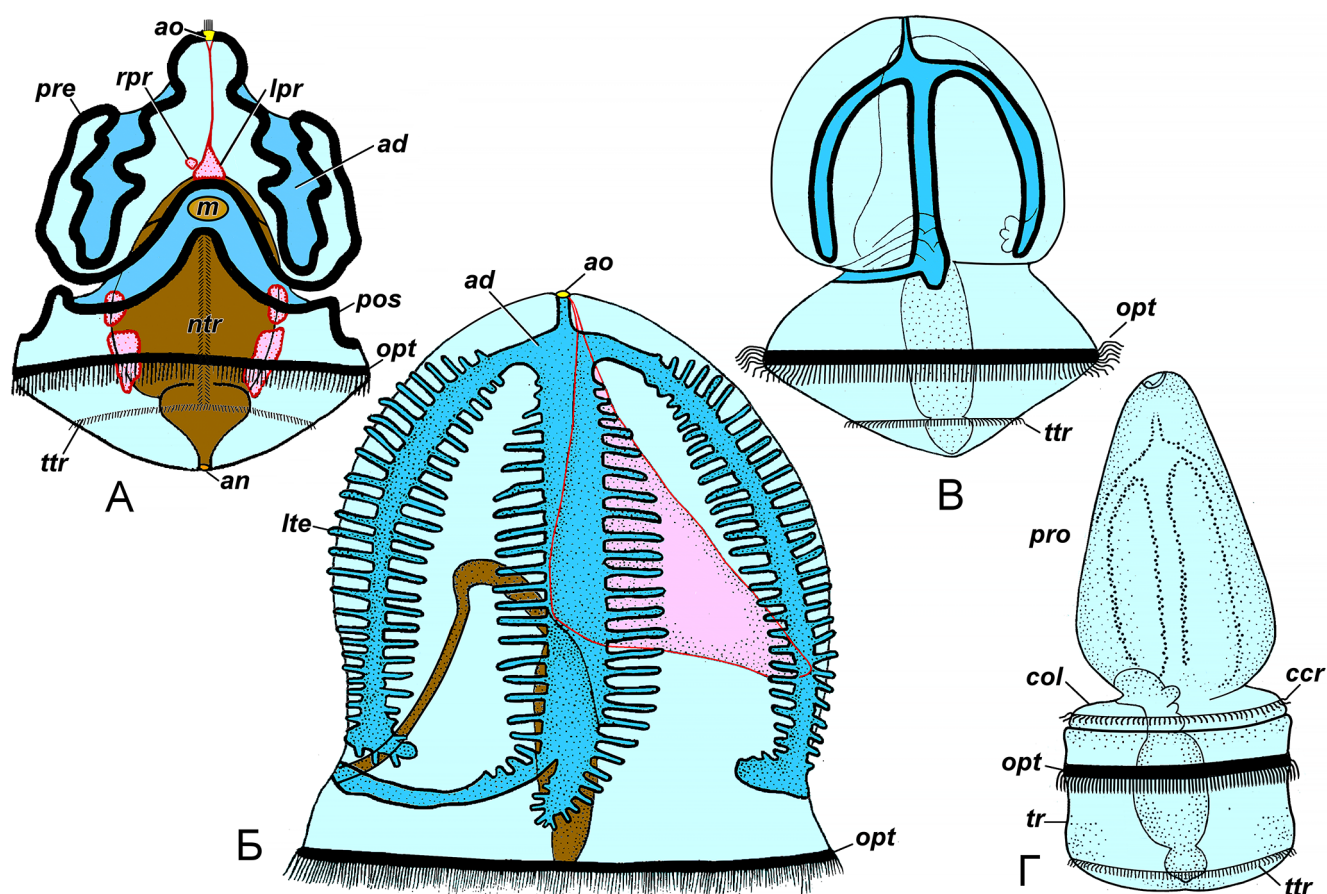


Рис. 4. Последовательные стадии развития Enteropneusta: А – развитая торнария – стадия Крона, Б – щупальцевая торнария – стадия Крона, В – стадия Шпенгеля, Г – стадия Агассица. Обозначения: ad – адоральное ресничное поле, an – анус, ao – апикальный орган, col – воротниковое ресничное кольцо, lpr – левый протоцель, m – рот, ntr – нейротрох, opt – опистотрох, pos – посторальный ресничный шнур, pre – преоральный ресничный шнур, pro – зачаток хоботного отдела, rpr – правый протоцель, tr – зачаток туловищного отдела, ttr – телотрох. А – по: Stiasny-Wijnhoff, 1926; Б–Г – по: Morgan, 1891. Отделы целома показаны розовым цветом.

уменьшается в размере, щупальца и ресничные шнуры дегенерируют, появляется глубокая перетяжка, отделяющая будущий хоботный отдел. Эту промежуточную стадию принято называть стадией Шпенгеля (рис. 4В). На следующей стадии Агассица от ресничных шнуров остаются лишние реснички бороздки на поверхности конического хоботного отдела, резко отделенного от задней части личинки [69, 77]. Превращение торнарии в стадию Агассица происходит очень быстро и занимает всего 11–12 ч, дальнейший метаморфоз стадии Агассица в ювенильную особь кишечнотрофного протекает постепенно и растягивается на 9–10 сут [59]. Все это время личинка не питается и существует за счет запасов, накопленных планктотрофной торнарией.

У личинки Агассица появляется перетяжка, разделяющая воротниковый и туловищный отделы (рис. 4Г). На зачатке воротникового отдела обособляется воротниковое ресничное кольцо [69]. Личинка несет три ресничных кольца: воротниковое ресничное кольцо, опистотрох и перианальное ресничное кольцо, или собственно телотрох (рис. 4Г). Таким образом, помимо планктотрофной торнарии в жизненном цикле кишечнотрофных имеет резервотрофная личинка (стадия Агассица), которая плавает с помощью трех ресничных колец разной мощности.

Соображения относительно эволюции личиночного развития полухордовых

В эволюции личиночного развития полухордовых имеются те же тенденции, что и в развитии иглокожих. У Spengelidae и Ptychoderidae большинство изученных видов имеют развитие с планктотрофной торнарией и резервотрофной личинкой Агассица [38, 40]. У представителей семейства Harrimaniidae планктотрофная личинка отсутствует, и из яйца выходит лецитотрофная личинка, соответствующая по строению стадии Агассица [78–80]. Она плавает в придонном слое воды в течение 6–7 сут с помощью хорошо развитого ресничного кольца — опистотроха. На 6–7-е сут опистотрох редуцируется, прорываются рот и анус, и ювенильная особь переходит к донному существованию, зарываясь в грунт с помощью постанального хвостика. У *Saccoglossus otagoensis* вышедшая из яйца личинка не имеет ресничных колец, она не плавает, а медленно ползает по дну с помощью равномерного ресничного покрова [81]. У представителей класса Graptolithoidea (=Pterobranchia) из яиц выходят ползающие плануло-подобные личинки с равномерным ресничным покровом [82–87].

Начиная с 1910 г., в планктонных ловах в различных районах Мирового океана — как правило, вдали от берегов — изредка находили очень крупных (диаметром до 22 мм) личинок, которые были описаны под названием *Planctosphaera pelagica* (рис. 2Б). Несмотря на гигантские размеры, ана-

томическая организация планктосферы близка к таковой торнарии кишечнотрофных [88–91]. План строения ресничного шнура планктосферы также соответствует таковой торнарии, а механизм питания планктосфер — это «up-stream»-фильтрация [87]. Ни у одной из пойманных планктосфер не обнаружено зачатков половой системы. В составе класса Enteropneusta известны виды, обитающие на глубинах батииали и абиссали [92–97]. Биология размножения глубоководных Enteropneusta не изучена. Не исключено, что под названием *Planctosphaera pelagica* описаны личинки одного или нескольких видов глубоководных Torquaratoridae, подобно тому, как *Auricularia nudibranchiata* оказалась личинкой глубоководной голотурии *Protankyra brychia* (см. выше). Таким образом, у полухордовых, вероятно, реализуется и другая эволюционная тенденция (которая встречается также и у иглокожих) — гипертрофированное развитие планктотрофных личинок.

Заключение

Как оказалось, жизненные циклы Echinodermata и Hemichordata сходны в том отношении, что в результате эмбрионального развития в обеих группах формируются планктотрофные личинки со сходной организацией адорального ресничного поля и ресничных шнуров, сменяющиеся резервотрофными личинками, для которых характерна редукция ресничных шнуров и плавание с помощью ресничных колец. Можно предполагать, что подобный тип личиночного развития был свойствен общему предку иглокожих и полухордовых и, таким образом, наличие двух личинок — планктотрофной и резервотрофной — представляет собой синапоморфию таксона Ambulacraria. Одна из главных эволюционных тенденций у иглокожих — это редукция резервотрофной личинки, так что планктотрофная личинка сразу приступает к метаморфозу, минуя стадию долиолярии (как это имеет место у Echinoidea, Ophiuroidea и Asteroidea). У морских лилий, наоборот, редуцируется планктотрофная личинка, а долиолярия становится не резервотрофной, а лецитотрофной. У полухордовых исходный жизненный цикл с двумя личиночными формами сохраняется у Ptychoderidae и Spengelidae, тогда как Harrimaniidae демонстрируют редукцию планктотрофной торнарии при сохранении лецитотрофной личинки с ресничными кольцами (стадия Агассица). И, наконец, в обоих таксонах реализуется тенденция к развитию гигантских планктотрофных личинок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00047). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Müller J. Über die Larven und die Metamorphose der Echinodermen. Berlin: Konigl. Acad. Wiss.; 1849. 37 S.
2. Krohn A. Beobachtungen über Echinodermenlarven. *Archiv Anat. Physiol. wiss. Medicin.* 1854:208–213.
3. Metschnikoff E. Untersuchungen über die Metamorphose einiger Seethiere. *Zeits. wiss. Zool.* 1870;20(1):131–144.
4. Metschnikoff E. Über die systematische Stellung von *Balanoglossus*. *Zool. Anz.* 1881;4(1):39–157.
5. Furlong R.F., Holland P.W.H. Bayesian phylogenetic analysis supports monophyly of Ambulacraria and of Cyclostomes. *Zool. Sci.* 2002;19(2):593–599.
6. Dohle W. Die Verwandtschaftsbeziehungen der Grossgruppen der Deuterostomier: Alternative hypothesen und ihre begründungen. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin.* 2004;43(1):123–162.
7. Peterson K.J. Isolation of *Hox* and *Parahox* genes in the hemichordate *Ptychodera flava* and the evolution of deuterostome *Hox* genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004;31(6):1208–1215.
8. Cameron C.B. A phylogeny of the hemichordates based on morphological characters. *Can. J. Zool.* 2005;83(1):196–215.
9. Formery L., Schubert M., Croce J.C. Ambulacrarians and the ancestry of deuterostome nervous systems. *Evo-Devo: Non-model Species in Cell and Developmental Biology, Results and Problems in Cell Differentiation*, vol. 68. Eds. W. Tworzydło, S.M. Bilinski. Switzerland: Springer Nature; 2019:31–59.
10. Selenka E. Zur Entwicklung der Holothurien *Holothuria tubulosa* und *Cucumaria doliolum*. *Zeits. wiss. Zool.* 1876;27(1):155–187.
11. Runnström J., Runnström S. Über die Entwicklung von *Cucumaria frondosa* und *Psolus phantapus*. *Bergens Mus. Arb.* 1918–1919;5(1):1–99.
12. Holland N.D. Electron microscopic study of development in a sea cucumber, *Stichopus tremulus* (Holothuroidea), from unfertilized egg through hatched blastula. *Acta Zoologica.* 1981;62(2):89–111.
13. Smiley S. Metamorphosis of *Stichopus californicus* and its phylogenetic significance. *Biol. Bull.* 1986;171(3):611–631.
14. Малахов В.В., Черкасова И.В. Эмбриональное и раннее личиночное развитие голотурии *Stichopus japonicus* var. *armatus* (Aspidochirota, Stichopodidae). *Зоол. журн.* 1991;70(4):55–67.
15. Малахов В.В. Черкасова И.В. Метаморфоз голотурии *Stichopus japonicus* (Aspidochirota, Stichopodidae). *Зоол. журн.* 1992;71(9):11–21.
16. Metschnikoff E. Studien über die Entwicklung der Echinodermen und Nemertinen. *Mem. Acad. Sci. St.-Petersburg. Ser. 7.* 1869;14(1):1–73.
17. McCauley B.S., Wright E.P., Exner C., Kitazawa C., Hinman V.F. Development of an embryonic skeletogenic mesenchyme lineage in a sea cucumber reveals the trajectory of change for the evolution of novel structures in echinoderms. *EvoDevo.* 2012;3(1):17.
18. Müller J. Über die Larven und die Metamorphose der Echinodermen. Berlin: Konigl. Acad. Wiss.; 1852. 50 S.
19. Strathmann R.R. Larval Feeding in Echinoderms. *Amer. Zool.* 1975;15(3):717–730.
20. Hart M.W. Variation in suspension feeding rates among larvae of some temperate, eastern Pacific echinoderms. *Invertebr. Biol.* 1996;115(1):30–45.
21. Soliman T., Yamazaki Y., Niiyama H., Tsunoda K. Spontaneous captive breeding and larval development in the green and red variants of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka 1867). *Aquac. Res.* 2013;44(4):738–746.
22. Rakaj A., Fianchini A., Boncagni P., Scardi M., Cataudella S. Artificial reproduction of *Holothuria polii*: A new candidate for aquaculture. *Aquaculture.* 2019;498(2):444–453.
23. Laguerre H., Raymond G., Plan P., Améziane N., Bailly X., Le Chevalier P. First description of embryonic and larval development, juvenile growth of the black sea-cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea), a new species for aquaculture in the north-eastern Atlantic. *Aquaculture.* 2020;521(3):734961.
24. Sewell M.A., Hamel J.-F., Mercier A. Morphological diversity, development, and biology of sea cucumber larvae. *The World of Sea Cucumbers. Challenges, Advances, and Innovations*. Eds. A. Mercier, J.-F. Hamel, A. Suhrbier, and C. Pearce. Academic Press; 2024:237–256.
25. Morgan A. Metamorphosis in larvae of the temperate sea cucumber *Australositchopus mollis*. *Invert. Repr. Dev.* 2008;51(3):127–143.
26. Semon R. Die Entwicklung der *Synapta digitata* und ihre Bedeutung für die Phylogenie der Echinodermen. *Jenaische Zeitschr. Naturwiss.* 1888;22(2):175–309.
27. Chun C. Atlantis. Biologische Studien über pelagische Organismen *Auricularia nudibranchiata*. *Bibliotheca Zoologica.* 1896;19(1):55–75.
28. Ohshima H. Note on a gigantic form of *Auricularia* allied to *A. nudibranchiata* Chun. *Annotationes Zoologicae Japonensis.* 1911;7(5):347–352.
29. Pawson D.L., Gage J.D., Belyaev G.M., Mironov A.N., Smirnov A.V. The deep sea synaptid *Protankyra brychia* (Echinodermata: Holothuroidea) and its nearsurface dwelling planktotrophic larva, *Auricularia nudibranchiata*. *Sarsia.* 2003;88(3):159–174.
30. Pawson D.L. Second New Zealand record of the holothurians giant larva *Auricularia nudibranchiata* Chun. *New Zealand J. Mar. Fresh. Res.* 1971;5(2):381–387.
31. Smiley S., McEuen F. S., Chafee C., Krishnan S. Echinodermata: Holothuroidea. *Reproduction of marine invertebrates*, vol. 6. Eds. A.C. Giese, J.S. Pearse, V.B. Pearse. California: Boxwood Press; 1991:663–750.
32. Dautov S.S., Kashenko S.D. Hyaline spheres in auricularia of *Stichopus japonicus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 1995;27(1):61–64.
33. Dolmatov I.Y., Ginanova T.T., Frolova L.T. Metamorphosis and definitive organogenesis in the holothurians *Apostichopus japonicus*. *Zoomorphology.* 2016;135(1):173–188.
34. Peters-Didier J., Sewell M.A. The role of the hyaline spheres in sea cucumber metamorphosis: lipid storage via transport cells in the blastocoels. *EvoDevo.* 2019;10(1):8.
35. Bury H. The metamorphosis of echinoderms. *Quart. J. Micr. Sci.* 1895;38(1):45–135.
36. Lacalli T.C., West J.E. The auricularia-to-doliolaria transformation in two aspidochirote holothurians, *Holothuria mexicana* and *Stichopus californicus*. *Invertebr. Biol.* 2000;119(2):421–432.
37. Иванова-Казас О.М. Природа бочонковидных личинок иглокожих. *Зоол. журн.* 1973;52(5):883–890.
38. Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Иглокожие и полухордовые. М.: Наука; 1978. 166 с.

39. Иванова-Казас О.М. Анализ личиночного развития низших Deuterostomia. *Онтогенез*. 1992;2(1):179–187.
40. Иванова-Казас О.М. *Эволюционная эмбриология животных*. СПб.: Наука; 1995. 565 с.
41. McEdward L.R., Miner B.G. Larval and life-cycle patterns in echinoderms. *Can. J. Zool.* 2001;79(9):1125–1170.
42. Ohshima H. On the development of *Cucumaria echinata*. *Q. J. Microsc. Sci.* 1921;65(1):173–246.
43. Runnström S. Entwicklung von *Leptosynapta inhaerens*. *Bergens Museum Aarbook*. 1928;1(1):1–80.
44. Inaba D. Notes on the development of a holothurian *Caudina chilensis*. *Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. 4. Biol.* 1930;5(2):215–248.
45. McEuen F.S., Chia F.S. Development and metamorphosis of two psolid sea cucumbers, *Psolus chitonoides* and *Psolidium bullatum*, with a review of reproductive patterns in the family Psolidae (Holothuroidea: Echinodermata). *Mar. Biol.* 1991;109(2):267–279.
46. Edwards C.L. Development of *Holothuria floridana*. *J. Morphol.* 1909;20(1):211–230.
47. Newth H. On the early development of *Cucumaria*. *Proc. Zool. Soc. London*. 1916;2(4):631–641.
48. Dolmatov I.Y., Yushin V.V. Larval development of *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea, Dendrochirota). *Asian. Mar. Biol.* 1993;10(1):125–134.
49. Guisado C., Carrasco S.A., Díaz-Guisado D., Maltrain R., Rojas H. Embryonic development, larval morphology and juvenile growth of the sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 2012;47(1):65–73.
50. Inaba D. On some holothurian larvae and young from New Guinea. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 1934;2(5):213–216.
51. Grave C. On the occurrence among echinoderms of larvae with cilia arranged in transverse rings, with a suggestion as to their significance. *Biol. Bull.* 1903;5(3):169–186.
52. Grave G. *Ophiura brevispina*. *Mem. Natl. Acad. Sci.* 1899;8(4):1–166.
53. Barrois J. Recherches sur le développement de la comatule *Comatula mediterranea*. *Rec. Zool. Suisse*. 1888;1(4):546–651.
54. Bury H. The early stages in the development of *Antedon rosacea*. *Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B*. 1888;179(2):257–301.
55. Kubota H. Development of *Comanthus japonica*. I. From spawning to attachment. *Jap. J. Develop. Biol.* 1969;23(1):92–93.
56. Holland N.D., Kubota H. Correlated scanning and transmission electron microscopy of larvae of the feather star *Comanthus japonica* (Echinodermata: Crinoidea). *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 1975;94(1):58–70.
57. Nakano H., Hibino T., Oji T., Hara Y., Amemiya S. Larval stages of a living sea lily (stalked crinoid echinoderm). *Nature*. 2003;421(6241):158–160.
58. Tagawa K., Nishino A., Humphreys T., Satoh N. The spawning and early development of the Hawaiian acorn worm (hemichordate), *Ptychodera flava*. *Zool. Sci.* 1998;15(1):85–91.
59. Urata M., Yamaguchi M. The development of the enteropneust hemichordate *Balanoglossus misakiensis* Kuwano. *Zool. Sci.* 2004;21(5):533–540.
60. Urata M., Iwasaki S., Ohtsuka S., Yamaguchi M. Development of the swimming acorn worm *Glandiceps hacksi*: similarity to holothuroids. *Evol. Dev.* 2014;16(3):149–154.
61. Gonzalez P., Jiang J. Z., Lowe C.J. The development and metamorphosis of the indirect developing acorn worm *Schizocardium californicum* (Enteropneusta: Spengelidae). *Front. Zool.* 2018;15(2):26.
62. Jabr N., Gonzalez P. M., Kocot K., Cameron C. B. The embryology, metamorphosis, and muscle development of *Schizocardium karankawa* sp. nov. (Enteropneusta) from the Gulf of Mexico. *EvoDevo*. 2023;14(10):6.
63. Малахов В.В., Богомолова Е.В., Кузьмина Т.В., Темерева Е.Н. Эволюция жизненных циклов Metazoa и происхождение пелагических личинок. *Онтогенез*. 2019;50(6):383–397.
64. Malakhov V.V., Gantsevich M.M. The origin and main trends in the evolution of bilaterally symmetrical animals. *Paleontol. J.* 2022;56(8):887–937.
65. Garstang W. *Spolia Bermudiana*. I. On a remarkable new type of *Auricularia* larva (*A. bermudensis* n.sp.). *Quart. J. Microsc. Sci. N.S.* 1939;81(2):321–345.
66. Jägersten G. *Evolution of the metazoan life cycle: A comprehensive theory*. L., N.Y.: Academic Press; 1972. 282 pp.
67. Lacalli T.C., Gilmour T.H.J. Locomotory and feeding effectors of the tornaria larva of *Balanoglossus biniensis*. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 2001;82(1):117–126.
68. Nakajima Y., Humphreys T., Kaneko H., Tagawa K. Development and neural organization of the tornaria larva of the Hawaiian hemichordate, *Ptychodera flava*. *Zool. Sci.* 2004;21(1):69–78.
69. Nielsen C., Hay-Schmidt A. Development of the enteropneust *Ptychodera flava*: ciliary bands and nervous system. *J. Morphol.* 2007;268(4):551–570.
70. Morgan T.H. The growth and metamorphosis of *Tornaria*. *J. Morphol.* 1891;5(2):407–458.
71. Morgan T.H. The development of *Balanoglossus*. *J. Morphol.* 1894;9(1):1–86.
72. Stiasny G. Studium über die Entwicklung des *Balanoglossus clavigerus* Delle Chiaje. I. Die Entwicklung der Tornaria. *Mitt. Zool. Stat. Neapel*. 1914;22(1):36–75.
73. Stiasny-Wijnhoff G., Stiasny G. Über Tornarien-Typen und ihre Beziehung zur Systematik der Enteropneusten. *Zool. Anz.* 1926;68(2):159–165.
74. Strathmann R., Bonar D. Ciliary feeding of tornaria larvae of *Ptychodera flava* (Hemichordata: Enteropneusta). *Mar. Biol.* 1976;34(2):317–324.
75. Spengel J.W. Die Enteropneusten des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. *Fauna und Flora des Golfes von Neapel, B. 18*. Leipzig: Engelmann; 1893:1–756.
76. Stiasny G. Studien über die Entwicklung von *Balanoglossus clavigerus* D.Ch. *Zool. Anz.* 1913;42(2):487–500.
77. Kaul-Strehlow S., Röttinger E. Hemichordata. *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates*, vol. 6. Ed. A. Wanninger. Wien: Springer-Verlag; 2015. 60–89.
78. Burdon-Jones C. Development and biology of the larva of *Saccoglossus horsti* (Enteropneusta). *Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B*. 1952;236(4):553–590.
79. Lowe C.J., Tagawa K., Humphreys T., Kirschner M., Gerhart J. Hemichordate embryos: Procurement, culture, and basic methods. *Methods Cell Biol.* 2004;74(2):171–194.
80. Kaul-Strehlow S., Stach T. A detailed description of the development of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* using SEM, TEM, Histology and 3D-reconstructions. *Front. Zool.* 2013;10(4):53.
81. Kirk H. Breeding habits and early development of *Dolichoglossus otagoensis*. *Trans. Proc. Roy. Soc. N. Z.* 1938;68(1):49–50.

82. Stebbing A.R.D. Aspects of the reproduction and life cycle of *Rhabdopleura compacta* (Hemichordata). *Mar. Biol.* 1970;5(2):205–212.
83. Dilly P.N. The larva of *Rhabdopleura compacta* (Hemichordata). *Mar. Biol.* 1973;18(1):69–86.
84. Lester S.M. Ultrastructure of adult gonads and development and structure of the larva of *Rhabdopleura normani* (Hemichordata: Pterobranchia). *Acta. Zool.* 1988;69(1):95–109.
85. Sato A., Bishop J.D.D., Holland P.W.H. Developmental biology of pterobranch hemichordates: history and perspectives. *Genesis*. 2008;46(4):587–591.
86. Stach T. Larval anatomy of the pterobranch *Cephalodiscus gracilis* supports secondarily derived sessility concordant with molecular phylogenies. *Naturwissenschaften*. 2013;100(10):1187–1191.
87. Strano F., Micaroni V., Beli E., Mercurio S., Scari G., Pennati R., Piraino S. On the larva and the zooid of the pterobranch *Rhabdopleura recondita* Beli, Cameron and Piraino, 2018 (Hemichordata, Graptolithina). *Mar. Biodiv.* 2019;49(10):1657–1666.
88. Spengel J.W. *Planctosphaera pelagic*. Report on the Scientific Results of the 'Michael Sars' North Atlantic Deep-Sea Expedition. 1910. 1932;5:1–27.
89. Horst C.J. *Planctosphaera* and *Tornaria*. *Quart. J. Microsc. Sci.* 1936;78:605–613.
90. Damas D., Stiasny G. Les larves planctoniques d'enteropneustes (*Tornaria* et *Planctosphaera*). *Mém. Acad. Roy. Sci. Belgique. Ser. 2*. 1941;15(1):1–70.
91. Hadfield M.G., Young R.E. *Planctosphaera* (Hemichordata: Enteropneusta) in the Pacific Ocean. *Mar. Biol.* 1983;73(1):151–153.
92. Hart M.W., Miller R.L., Madin L.R. Form and feeding mechanism of a living *Planctosphaera pelagica* (phylum Hemichordata). *Mar. Biol.* 1994;120(4):521–533.
93. Holland N.D., Clague D.A., Gordon D.P., Gebruk A., Pawson D.L., Vecchione M. 'Lophenteropneust' hypothesis refuted by collection and photos of new deep-sea hemichordates. *Nature*. 2005;434(6372):374–376.
94. Holland N.D., Osborn K.J., Gebruk A.V., Rogacheva A. Rediscovery and augmented description of the HMS 'Challenger' acorn worm (Hemichordata, Enteropneusta), *Glandiceps abyssicola*, in the equatorial Atlantic abyss. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2013;93(12):2197–2205.
95. Holland N.D., Hiley A.S., Rouse G.W. A new species of deep-sea torquaratorid enteropneust (Hemichordata): a sequential hermaphrodite with exceptionally wide lips. *Invertebr. Biol.* 2022;141(6):e12379.
96. Osborn K.J., Kuhn L.A., Priede I.G., Urata M., Gebruk A.V., Holland N.D. Diversification of acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) revealed in the deep sea. *Proc. R. Soc. B*. 2012;279(11):1646–1654.
97. Ezhova O.V., Lukinykh A.I., Galkin S.V., Krylova E.M., Gebruk A.V. Deep-Sea acorn worms (Enteropneusta) from the Bering Sea with the description of a new genus and a new species of Torquaratoridae dominating soft-bottom communities. *Deep Sea Res. II*. 2022;195(1):105014.

Поступила в редакцию 29.07.2024

После доработки 10.11.2024

Принята в печать 18.12.2024

REVIEW

General patterns of the ontogenesis of Ambulacraria

V.V. Malakhov , O.V. Ezhova , I.A. Ekimova , M.M. Gantsevich* 

Department of Invertebrate zoology, Faculty of biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: mgantsevich@gmail.com

The life cycle with two larvae (planktotrophic and reserve-trophic) is assumed to be a synapomorphy of Ambulacraria. Planktotrophic larvae have a complex ciliary band and use the "up-stream" filtration for nutrition. Planktotrophic larvae undergo metamorphosis and turn into non-feeding larvae with complete or incomplete ciliary rings. These larvae do not use the yolk, but the reserves stored at the previous planktotrophic stage, therefore they can be called reserve-trophic. Among echinoderms, holothurian life cycle is assumed to be plesiomorphic. It includes a planktotrophic larva (auricularia) followed by a reserve-trophic larva (doliolaria). Most echinoderms have lost their reserve-trophic larvae, although rudimentary doliolarians are known in some sea urchins and brittle stars. Most crinoids have doliolaria larvae only, although stalked sea lilies have auricularia followed by doliolaria, but both larvae are lecithotrophic. In enteropneusts, Spengelidae and Ptychoderidae have planktotrophic tornarians followed by reserve-trophic Agassiz larvae. Species of the Harrimaniidae have lost tornarians, but have retained the lecithotrophic Agassiz larvae. The giant planktotrophic larvae were recorded both in echinoderms and hemichordates. The deep-sea holothurian *Protankyra brychia* has giant larva known by the name *Auricularia nudibranchiata*. It is possible that the giant tornarian known by the name *Planctosphaera pelagica* is a larva of some species of deep-sea enteropneust.

Keywords: *Ambulacraria*, *auricularia*, *doliolaria*, *tornaria*, *Agassiz larva*, *Planctosphaera*, *evolution*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-14-00047.

Сведения об авторах

Малахов Владимир Васильевич — докт. биол. наук, проф., акад. РАН, зав. кафедрой зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: vmalakhov@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1637-2354>

Ежова Ольга Владимировна — канд. биол. наук, доц. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: olga_ejova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4533-7769>

Екимова Ирина Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: irenekimova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1846-0780>

Ганцевич Михаил Маркович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: mgantsevich@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4854-2787>

ОБЗОР

УДК 577.29+616-004



Рассеянный склероз. Некоторые особенности патологии и возможные пути терапии. Часть 2

Е.К. Фетисова¹ , Н.В. Воробьева² , М.С. Мунтян^{1,*}

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

²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: muntyan@genebee.msu.ru

Рассеянный склероз (РС) входит в число наиболее распространенных неврологических заболеваний. Количество страдающих от РС постоянно растет во всем мире. Заболевание в отсутствие лечения приводит к инвалидизации наиболее трудоспособной части населения молодого возраста, а в последние годы стало все чаще диагностироваться и у пожилых пациентов. Вторая часть нашего обзора посвящена перспективам методов терапии РС, находящихся в стадии разработки. В качестве мишеней при лечении РС рассмотрены митохондрии с использованием митохондриально-направленных антиоксидантов, нейтрофилы, а также затронутые патологией клетки иммунитета и другие специализированные клетки, перепрограммировать и заместить которые на здоровые можно при помощи стволовых клеток, незрелые олигодендроциты, ускоренно созревающие и вызывающие ремиелинизацию аксонов при воздействии антигистаминного препарата. Гельминтотерапия, сопровождающаяся смещением состава микробиоты больных РС и выделением антиоксидантов в ткани человека и модельных животных, может приводить к иммуномодуляции и снижению окислительного стресса, обеспечивая значительное ослабление заболевания. Обсуждаются подходы к лечению пожилых больных РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, окислительный стресс, активные формы кислорода, нейтрофилы, митохондриально-направленные антиоксиданты, стволовые клетки, гельминтотерапия, старение

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-1

Сокращения:

АФК — активные формы кислорода;
АФА — активные формы азота;
МАО — митохондриально-направленные антиоксиданты;
ММП — матриксная металлопротеиназа;
МРТ — магнитно-резонансная томография;
МСК — мезенхимальные стволовые клетки;
НСК — нейрональные стволовые клетки;
РКИ — рандомизированное контролируемое испытание;
РС — рассеянный склероз;
СК — стволовые клетки;
СКК — стволовые кроветворные клетки;
ЭАЭ — экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит;

GTDB — Genome Taxonomy Database (постоянно обновляемая он-лайн база данных по номенклатуре прокариот и архей, введенная 9 июля 2019 г. в обязательную практику после симпозиума FEMS-2019);

iNOS — индуцибельная NO-синтаза;

MBP — myelin basic protein (основной белок миелина);

NETs — neutrophil extracellular traps (нейтрофильные внеклеточные ловушки);

NOX2 — НАДФН-оксидаза;

PAD4 — protein-arginine deiminase type IV (протеин-аргинин-деиминаза 4);

RRMS — relapsing-remitting multiple sclerosis (рецидивирующе-ремиттирующий подтип РС);

TNF- α — tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли).

Рассеянный склероз (РС) — тяжелое неврологическое заболевание, которое на настоящий момент является неизлечимым. В последнее время появились новые фармакологические препараты, позволяющие облегчать симптомы заболевания и добиваться ремиссии [1–3]. Однако с ростом распространенности РС в мире возникают и новые проблемы, в частности, смещение пика распространенности заболевания в группу возрастных пациентов, у которых терапия РС затруднена [4–6]. Поздние формы заболевания также плохо поддаются терапии у пациентов всех возрастных групп. Возникает необходимость поиска новых потенциальных путей терапии РС. Многие описанные в первой части обзора факторы патогенеза РС могут выступать в качестве мишеней при терапии заболевания [7]. Так, нейтрофилы являются клетками врожденного иммунитета, генерирующими активные формы кислорода (АФК), а также обладающими способностью к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs) — эффекторной функцией, провоцирующей одновременно ряд воспалительных и аутоиммунных заболеваний. В этой связи нейтрофилы являются перспективной мишенью при разработке методов лечения РС. Другим источником избыточного потока АФК в условиях патологии являются митохондрии. Это позволяет рассматривать разработку и применение митохондриально-направленных антиоксидантов нового поколения (МАО) как одно из потенциальных средств для смягчения патологического процесса. Гельминтотерапия сопровождается выделением антиоксидантов в ткани испытуемых и смещением состава микробиоты больных РС, что создает, соответственно, условия для (1) борьбы с окислительным стрессом и (2) иммуномодуляции. Терапия с использованием стволовых клеток позволяет перепрограммировать патологически измененные клетки пациента с последующим замещением их здоровыми. Усовершенствование этих методов может привести к существенному прогрессу в лечении РС. Этим перспективам терапии РС посвящена представленная вторая часть нашего обзора.

Нейтрофилы как мишень при разработке новых лекарственных средств

Новые подходы в терапии РС могут возникнуть в результате изучения еще не до конца познанных клеточных и молекулярных эффектов, связанных с участием нейтрофилов в развитии РС. Одной из защитных функций нейтрофилов является образование NETs — выбрасывании из нейтрофилов преимущественно ядерной ДНК с целью захвата и изоляции патогенов [8, 9]. Было обнаружено, что уровень NETs повышен в сыворотке крови пациентов с РС по сравнению со здоровыми людьми предположительно из-за воспалитель-

ной среды, ответственной за праймирование нейтрофилов [10].

Еще одним известным свойством нейтрофилов является способность к цитруллинированию белков благодаря экспрессии в них изоформы фермента пептидил-аргинин-деиминазы 4 (PAD4). При РС в тканях мозга наблюдается повышение активности PAD4, в результате которого происходит цитруллинирование основного белка миелина (МВР). Эта модификация приводит к разворачиванию структуры МВР с последующим расщеплением его протеазами и появлением антиген-презентируемых эпитопов, что в свою очередь становится триггером для аутоиммунного ответа. Установлено также, что нейтрофилы, кроме провоспалительных функций, усугубляющих заболевание РС, обладают способностью секретировать основную матриксную металлопротеиназу ММП-9, которая также способствует патогенезу заболевания. Интересно, что эндогенная индукция антагониста ММП-9 (тканевого ингибитора металлопротеиназ-1, не синтезируемого нейтрофилами) при участии онкостатина М способна приводить к ремиелинизации на модели РС с купризомом у животных. Наблюдения показали, что развитие заболевания сопровождается также разрушением гематоэнцефалического барьера, в том числе с участием нейтрофилов, и скоплением нейтрофилов и других лейкоцитов в эндотелиальном слое через образовавшиеся разрывы, что также усиливает воспалительный процесс в головном мозге. В этом контексте нужно отметить, что ряд препаратов (интерферон, финголимод, диметилфумарат, алемтузумаб), использующихся в терапии РС, снижает вовлеченность нейтрофилов в развитие заболевания. Перечисленные факты указывают на перспективность исследования роли NETs и других факторов в патогенезе РС и использования нейтрофилов в качестве мишеней при разработке лекарственных средств.

Одна из опасностей заболевания РС — в его лавинообразном нарастании и невозможности остановить патологический процесс, если лечение не проводится на ранних стадиях. В современной практике для лечения РС используется ряд препаратов, сдерживающих активность специфических лейкоцитов, атакующих миелин: кладрибин, sipонимод и другие. Однако эти препараты преимущественно приводят к снижению количества лимфоцитов и подавлению иммунитета, что делает человека уязвимым к различным инфекциям. В центр внимания попадает и риск прогрессивной мультифокальной лейкоэнцефалопатии при терапии РС окрелизумабом [11]. Как показали наши исследования, МАО нового поколения, SkQ1, хорошо справляется с функцией защиты миелиновых оболочек в культуре олигодендроцитов в условиях токсического стресса [12, 13]. Подобные эффекты МАО отмечают Фок и Парнова [14]. Это

позволяет предположить, что сочетание иммунотерапии с использованием новых МАО могло бы помочь обойти проблему побочных эффектов иммунодепрессантов, описанных выше.

Перспективы антиоксидантных соединений нового поколения

В настоящее время имеется множество доказательств, что окислительный стресс, приводящий к повышенному образованию АФК в организме и имеющий токсическое воздействие на живые ткани и биологические соединения, во многом определяет патогенез заболевания РС [7]. Отмечалось, что среди значительных источников образования АФК особого внимания заслуживают как митохондрии клеток мозга, олигодендроциты и активированной микроглии (см. рис. 4 в статье Фетисовой и соавт. [13]), так и клетки врожденного иммунитета, нейтрофилы. Генераторы АФК в указанных структурах имеют различную природу. В случае митохондрий в клетках, затронутых патологией, наиболее активными источниками АФК являются компоненты дыхательной цепи — комплекс I, комплекс II и комплекс III, а в нейтрофилах в результате их активации — ферменты НАДФН-оксидаза (NOX2) и миелопероксидаза. В активированной микроглии генераторами АФК являются как митохондрии, так и активированный фермент NOX2. Микроглия располагает еще одним ферментом, индуцибельной NO-синтазой (iNOS), которая в активированном состоянии способна генерировать активные формы азота (АФА), а АФА, в свою очередь, активируют NOX2, который генерирует АФК. Одно из направлений поиска нейтрализации токсического эффекта АФК в ходе терапии больных РС, а именно, применение антиоксидантов предыдущего поколения не принесло успеха, что может объясняться рядом причин [7]. Надежду на решение проблемы дало изобретение и синтез антиоксидантов нового поколения, МАО.

Основными преимуществами МАО перед безадресными препаратами являются (1) эффективная фармакокинетика и абсорбция, (2) специфическое многократное накопление в клетках и на несколько порядков более высокое в митохондриях, как показано ниже, что позволяет избежать неспецифических побочных эффектов, вызванных высокой концентрацией самих МАО [12]. Для первых МАО были разработаны системы доставки в митохондрии в виде векторов, основанных на липосомах; мито-портера, содержащего конденсированную плазмидную ДНК в липидной оболочке; липофильных катионов, встроенных в низкомолекулярные SS-пептиды; митохондриально-проникающих пептидов [12, 15]. В отличие от первых МАО, адресная доставка МАО нового поколения в митохондрии происходит по электрическому полю с помощью объемного липофильного катио-

на, ковалентно сшитого с антиоксидантной частью молекулы. Объемные липофильные катионы служат «локомотивом», обеспечивающим проникновение МАО через фосфолипидные мембраны. При этом накопление липофильных катионов в митохондриальном матриксе происходит в силу разности электрических потенциалов на внутренней митохондриальной мембране («минус» внутри митохондрий). Поскольку разность электрических потенциалов на митохондриальной мембране составляет около 140–160 мВ, это обуславливает почти 1000-кратное накопление липофильных катионов внутри митохондрий по сравнению с цитоплазмой [16]. На плазматической мембране клетки также имеется разность электрических потенциалов (30–60 мВ, «минус» внутри), так что результирующее накопление катионных соединений внутри митохондрий относительно внеклеточного окружения может возрасти в несколько тысяч раз, что позволяет применять эти соединения в чрезвычайно низких концентрациях. Примером такого часто используемого «локомотива» служит катион децилтрифенилфосфония, пришитый к различным антиоксидантным компонентам в МАО ряда SkQ- и MitoQ-соединений [12, 17–19].

Несмотря на то, что МАО показали положительные результаты на моделях многих заболеваний, а для ряда соединений были получены обнадеживающие результаты клинических испытаний фазы I или фаз I и II, в настоящий момент для терапевтического применения на человеке они не оптимизированы. Причины ограничения использования МАО в терапии следующие: а) поврежденные митохондрии по сравнению со здоровыми могут накапливать меньше молекул МАО из-за сниженного трансмембранного потенциала, поэтому МАО могут не выполнять свою функцию; б) молекулы МАО потенциально могут снижать количество митохондриальных АФК не только в поврежденных, но и в здоровых тканях, нарушая физиологически нормальный клеточный гомеостаз; в) из-за прооксидантных свойств некоторые МАО оказывались токсичными для клеток [20]. Так, клинические испытания МАО MitoQ показали нежелательные результаты для лечения болезни Паркинсона, что сказалось на отсутствии одобрения испытания митохондриальных антиоксидантов на основе пептидов. Тем не менее, MitoQ одобрен в качестве пищевой добавки, поскольку в низких концентрациях показал безопасность применения [20].

Отметим, что восстановленный SkQ1, но не окисленный, оказался одним из лучших современных МАО среди хинольных соединений [21]. Объясняется это тем, что замещение метоксигрупп в положениях 2 и 3 на метильные группы в SkQ1 привело к тридцатикратному увеличению концентрационного окна между анти- и прооксидантными свойствами SkQ1 по сравнению с MitoQ [18].

Такое улучшение антиоксидантных свойств дает преимущество соединениям SkQ-ряда для терапевтических целей. Антиоксиданты с новыми улучшенными свойствами можно рассматривать как перспективный компонент для будущих испытаний и составную часть терапии РС. Основная трудность на пути терапевтического использования этих соединений на нынешнем этапе заключается в неопределенных терапевтических дозах МАО для человека и методах доставки этих соединений к целевым органам и тканям. Имеется вероятность, что из-за липофильности такое соединение на пути к цели «уйдет» в мембраны первых тканей, с которыми встретится. В России начало преодолению этих трудностей положено исследователями соединения SkQ1. На базе Городской клинической больницы № 1 имени Н.И. Пирогова г. Москвы с участием 42 здоровых добровольцев проведены первые рандомизированные контролируемые испытания (РКИ) фазы I препарата Пластомитин, содержащего в качестве действующего вещества соединение SkQ1 [22]. РКИ показали безопасность перорального применения препарата Пластомитин, содержащего SkQ1 в дозах 1,7, 3,4, 6,8, и 13,6 мг в расчете на действующее вещество. При приеме в дозе 13,6 мг соединение SkQ1 обнаруживалось в крови большинства добровольцев, что дает основание предполагать биодоступность соединения для органов и тканей.

К настоящему моменту показано, что низкие концентрации многих МАО безопасны для терапии человека. Для оценки их оптимальных доз в случае ряда неврологических заболеваний на разных стадиях, долгосрочного влияния на органы и ткани и потенциальных побочных эффектов требуются дополнительные исследования [20].

Терапия с использованием стволовых клеток

Многообещающим направлением, разработанным на рубеже XX–XXI вв., является терапия РС путем трансплантации больным стволовых клеток (СК) различного типа. Впервые этот подход применили в США и Европе в 1997 г. [23]. В России первая трансплантация стволовых кроветворных клеток (СКК) человеку для лечения РС была проведена в 1999 г., а к 2017 г. ее провели 456 пациентам с различными формами РС. Метод заключается в том, что у больных последовательно проводят забор собственных СКК, химиотерапию для подавления иммунитета и трансплантацию собственных СКК. Лечение этим методом больных, у которых традиционные виды лечения не дали значимых результатов, более чем в 80% случаев приводило к длительной ремиссии. В исследовании, проведенном в Швеции, группа добровольцев из семи человек с прогрессирующим РС показала положительные изменения в иммунной системе через 7 сут после терапии мезенхимальными СК (МСК) [24]. Об-

следование мозга при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) через 12 нед. после лечения не выявило новых типичных поражений у 83% участников исследования. По данным исследователей из Беларуси, трансплантация МСК больным РС приводила к снижению инвалидизации, положительной динамике неврологического статуса, снижению активных очагов демиелинизации и увеличению толщины слоя нервных волокон сетчатки [25]. В России в трехгодичном исследовании на больных РС добились стабилизирующего эффекта с положительной динамикой инвалидизации в 90% случаев при помощи иммуносупрессивной терапии с трансплантацией аутологичных СКК [26]. Ученые из Италии показали, что при внутрибрюшинной и внутривенной трансплантации нейрональных СК (НСК) мышам с хроническим экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ) инициировались процессы нейропротекции и ремиелинизации, а функциональные нарушения, вызванные ЭАЭ, исчезали как клинически, так и нейрофизиологически [27].

Продолжение этого исследования в 2023 г. в ходе фазы I клинических испытаний в трехлетнем периоде показало, что интратекальная трансплантация аутологичных НСК безопасна и хорошо переносится пациентами. Данные показали более низкую скорость атрофии головного мозга у пациентов, получавших максимальную дозу НСК, и повышение уровня противовоспалительных и нейропротекторных молекул в спинномозговой жидкости [28]. Также были подтверждены результаты, ранее полученные на моделях болезни Альцгеймера у мышей, свидетельствующие, что трансплантация НСК уменьшает дефицит памяти за счет стимуляции нейрогенеза, синаптической пластичности и стабильности дендритов. Однако внутривенная трансплантация МСК в масштабных клинических испытаниях фазы II не дала положительного эффекта у больных с активной формой РС, хотя показала безопасность и хорошую переносимость [29]. Авторы отмечают, что на отрицательные результаты могли повлиять: тип СК, качество трансплантатов, дозировка/кратность, способы подготовки (наличие/отсутствие замораживания) и введения (интратекальный, внутривенный) трансплантатов. Недавно Сорокикова и соавт. провели анализ преимуществ и побочных эффектов при терапии РС разными типами СК по разным протоколам [30]. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования применения СК в терапии РС [31]. Новой ступенью в терапии РС может стать трансплантация без использования СК и связанных с этим побочных эффектов. В этой технике с помощью факторов транскрипции применяется прямое перепрограммирование соматических клеток в индуцированные НСК и индуцированные клетки-предшественники

олигодендроцитов, дифференцирующиеся в клетки с миелинизирующей активностью *in vitro* и *in vivo* [32, 33]. Для расширения знаний о путях преодоления побочных эффектов и возможностях эффективного и безопасного применения метода СК в терапии РС на людях требуются дальнейшие исследования, включающие клинические испытания фазы II и III.

Не затрагивающий трансплантацию клеток принципиально иной подход, использующий для ослабления симптомов РС антигистаминный препарат клемастин (блокатор H_1 -гистаминовых рецепторов), оказался эффективным при ремиелинизации нервных волокон мозга. Как показали постмортемные исследования клеток модели радиационной травмы крыс, клемастин способствует дифференцировке клеток-предшественников олигодендроцитов в олигодендроциты и, таким образом, приводит к миелинизации [34]. Прорывным оказалось достижение группы американских ученых в 2023 г., которые смогли доказать ремиелинизирующую способность клемастина путем первого прямого прижизненного наблюдения аксональной ремиелинизации в мозге пациентов с РС [35]. Эффект клемастина исследовали с помощью разработанного авторами инновационного метода на основе МРТ в группе из 50 пациентов с РС в двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании, в ходе которого удалось достичь восстановление миелина и последующее снижение замедления передачи нервных импульсов у пациентов. Таким образом, исследование может стать прологом к новым подходам в терапии РС с использованием антигистаминных препаратов.

Перспективы гельминтотерапии

Заманчивые перспективы терапии РС возникают на основе многолетних наблюдений за больными РС, инфицированными различными видами нематоды рода *Trichuris* [36–39] и другими кишечными паразитами, среди которых встречаются представители круглых червей (нематоды, р. Nematoda) — аскарида человека (*s. Ascaris lumbricoides*, g. *Ascaris*), угрица кишечная (*s. Strongyloides stercoralis*, g. *Strongyloides*), острица (*s. Enterobius vermicularis*, g. *Enterobius*); плоских червей (р. Platyhelminthes) — трематоды (с. Trematoda) и циклофиллиды (с. Cestoda), шистосома Мансона (*s. Schistosoma mansoni*, g. *Schistosoma*), печеночная двуустка (*s. Fasciola hepatica*, g. *Fasciola*), карликовый цепень (*s. Hymenolepis nana*, g. *Hymenolepis*) и др. [39]. В ряде работ отмечалось умеренное положительное влияние хронической гельминтозной инфекции на заболевших РС, что явилось основанием для выдвижения гигиенической гипотезы, согласно которой повышение уровня гигиены приводит к росту заболеваемости РС. Больные РС с гельминтозом в целом легче переносили заболе-

вание, что могло указывать на защитный эффект естественной гельминтоинфекции. Исследования на добровольцах с рецидивирующим РС, экспериментально зараженных круглыми червями-паразитами анкилостомы Нового Света (*s. Necator americanus*, g. *Necator*) [40], и на ЭАЭ-модели мышей после внутрибрюшинного введения продуктов секретиции *Trichuris suis* и перорального приема яиц *T. suis* [36] подтвердили умеренный лечебный эффект гельминтов.

По результатам МРТ у 51% пациентов, инфицированных *N. americanus*, по завершению эксперимента отсутствовали новые поражения центральной нервной системы по сравнению с 28% участников, получавших плацебо. Терапевтические эффекты гельминтизации у больных РС подкрепляются данными по изменению их иммунного профиля по сравнению с больными РС, избежавшими инвазии паразитов. Согласно рандомизированному двойному слепому плацебо-контролируемому исследованию фазы II, в крови больных с рецидивирующе-ремиттирующим подтипом РС (RRMS), зараженных *N. americanus*, как и у мышей с ЭАЭ после гельминтной терапии, наблюдалось значимое увеличение противовоспалительных цитокинов, периферических Т-хелперов (преимущественно клеток Th2), регуляторных CD4⁺CD25^{high}CD127^{neg} Т-клеток и эозинофилов, а также подавление экспансии аутоиммунных провоспалительных клеток Th1 и Th17, что указывало на подавление аутоиммунной реакции, возникающей при РС и ЭАЭ. Кроме того, в микробиоте добровольцев с РС, инфицированных *N. americanus*, в отличие от контрольной группы больных РС, сохранялся профиль кишечной микробиоты, характерный для здоровых людей, и увеличивался вклад бактерий штаммов *Tenericutes* класса Mollicutes (р. Mycoplasmatota, по классификации NCBI), соответствующего классу Bacilli (р. Bacillota, по классификации согласно номенклатуре прокариот и архей, GTDB), обладающих иммуномодулирующими свойствами и тенденцией к подавлению аутоиммунитета [41].

Предполагается, что селективными условиями для этих бактерий является Th2-содержащая среда, в которой индукторами повышения Th2, как показано на модели заболевания у крыс, являются гельминты [42]. Рассматривая роль гельминтизации в ослаблении симптомов РС, можно отметить приспособительное свойство гельминтов, связанное с их паразитическим образом жизни: для уклонения от АФК-опосредованного защитного ответа хозяина и закрепления в его теле эти паразиты используют видоспецифичные энзиматические и неэнзиматические антиоксидантные средства (тиоредоксин-глутатион-редуктазу, пероксидазу, супероксиддисмутазу, тиоредоксинпероксидазу, глутатионпероксидазу, глутатион-S-трансферазу, каталазу, пероксиредоксин, тиоредоксин) [43, 44].

При этом в отличие от млекопитающих, у гельминтов антиоксиданты секретируются не только внутрь их тела, но и в окружающую среду, т.е. в различные ткани хозяина. В этом контексте с терапевтическим эффектом гельминтов можно связать данные о защитной роли как искусственных, так и ряда природных антиоксидантов при демиелинизации [13, 14] и предположить, что антиоксидантные средства гельминтов являются частью механизма их терапевтического действия при РС. Однако исследование модуляции компонентов иммунитета показывает, что степень выраженности терапевтического эффекта гельминтоинфекции у больных РС значительно варьирует. Возможной причиной этого могут быть различия в силе Т-клеточного ответа и клеточной функциональности у пациентов [25]. Вероятно, глубже проникнуть в природу этих эффектов позволит использование в исследованиях не только самих гельминтов, но и выделенного из них действующего фактора.

Данные об ослаблении симптомов РС и более легком течении этого заболевания у людей, подвергшихся гельминтоинфекции, перекликаются с недавно опубликованными данными об ослаблении симптомов Covid-19 у людей, пораженных гельминтами *Trichinella spiralis*. Сообщалось, что предшествующая инвазия этих гельминтопаразитов у людей, подвергшихся вирусному заболеванию Covid-19, приводила к смягчению цитокинового шторма, вызванного иммунной системой заболевших и приводившего к гиперпродукции провоспалительных цитокинов первого типа, TNF- α и интерферона- γ [45], и даже предотвращению смертельного исхода. Как показало исследование, за смягчающий эффект отвечал противовоспалительный цитокин IL-9 [46]. Однако еще более выраженный эффект по сравнению с IL-9 продемонстрировали иммуномодулирующие продукты, секретируемые *T. spiralis*, состав которых пока до конца не изучен и отнесен к терапевтическим продуктам биологического происхождения. Исследование и понимание механизмов, с помощью которых *T. spiralis* и другие виды гельминтов, управляют иммунными ответами человека, является перспективной задачей на пути к разработке инновационных методов лечения воспалительных заболеваний человека.

Возможности терапии РС у возрастных пациентов

Рост числа пожилых пациентов с РС (возраст > 50 лет) во всем мире приводит к необходимости рассмотрения методов и подходов лечения, специфичных для данной группы пациентов. Так, в провинции Генуя (Италия) в 2007 г. распространенность РС в группе пожилых пациентов старше 60 лет составляла около 26%, старше 65 лет — 18% [47]. В провинции Манитоба (цен-

тральная область Канады) пик распространенности РС в зависимости от возраста на 100 000 населения постепенно смещался сторону увеличения возраста заболевших за период с 1984 по 2004 гг.: от возрастной группы 35–39 лет в 1984 г. к 40–44 годам в 1988 г., 45–49 годам в 2000 г. и 50–59 годам в 2004 г. [48]. При этом показатель распространенности РС в указанных возрастных пиках неуклонно возрастал с 80 случаев на 100 000 населения (1984 г.), до 184 (1988 г.), 416 (2000 г.) и 480 (2004 г.) случаев. О том, что пациенты с заболеванием РС в возрастной группе ≥ 50 лет не редкое явление и составляли 9,4% от всех больных РС, свидетельствуют данные, полученные в США с 1972 по 1980 гг. [49], а в 2004 г. пациенты с РС старше 65 лет составляли в США около 10% [50]. Причиной вышеуказанных тенденций являются как увеличение продолжительности жизни, так и прогресс в диагностике заболевания РС.

Выделение группы пожилых пациентов в отдельную категорию при подборе для них терапии РС обусловлено рядом изменений в организме человека при старении, которые в этой возрастной группе делают лечение неэффективным [51], хотя подобное лечение приводит к успеху в группе пациентов молодого и среднего возраста. К таким факторам относятся старение иммунной системы человека и присущая пожилым людям в целом коморбидность, а именно, приобретение комплекса заболеваний, включающих сердечно-сосудистые, аутоиммунные и онкологические заболевания, сахарный диабет II типа, прогрессирование снижения ментальных способностей, заболевания опорно-двигательного аппарата и другие возрастные заболевания [4, 7]. Ослабление иммунной системы ввиду ее старения у пожилых людей приводит к смещению преобладающих форм РС в сторону более тяжелых форм по сравнению с группами людей более молодого возраста. Как свидетельствуют медицинские наблюдения, для лиц пожилого возраста характерно преобладание прогрессирующих форм заболевания РС с тяжелым течением и симптомами, плохо поддающимися ослаблению, в отличие от группы пациентов молодого и среднего возраста, у которых преобладают ремиттирующие формы заболевания, легче поддающиеся сдерживающей терапии с возможностью остановки прогрессирования и выхода в длительные ремиссии.

Существует мнение, подтвержденное мета-анализом, что прогрессирующая форма РС является более поздней стадией заболевания [52]. К этому следует добавить позднюю выявляемость РС у пожилых пациентов, что обусловлено всеми вышеперечисленными факторами. В связи с этим у пожилых пациентов после 53 лет эффективность терапии лекарственными препаратами с выраженными иммуномодулирующими свой-

ствами снижается, а прогноз от приема таких препаратов становится неблагоприятным или необнадееживающим из-за отсутствия пользы от такого лечения. Напротив, у молодых пациентов более эффективные иммуномодулирующие препараты имеют преимущество перед менее эффективными, что согласно модели, опирающейся на метаанализ, соответствует более ранним стадиям РС у молодой возрастной группы. В то же время многочисленные данные показывают, что ранние стадии РС и раннее выявление заболевания являются решающим фактором в борьбе за сдерживание и остановку прогрессии РС, пока труднодостижимые у возрастных пациентов, что еще больше усиливает контраст в оценке перспектив терапии у молодых и пожилых групп населения [12].

Как отмечают Хуанг и соавт. [1] и Макарон и соавт. [3], схема распространенных терапевтических подходов борьбы с РС включает более 10 лекарственных средств, одобренных Европейским медицинским агентством (The European Medicines Agency, EMA) и Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (U.S. Food and Drug Administration, FDA). Названия части этих препаратов представлены ниже:

- наряду с вакциной фамцикловир (Famciclovir) против инфекции вируса Эпштейна-Барр, являющегося одной из главных угроз развития РС [53], это – диметил фумарат (Dimethyl fumarate, Tecfidera) и препарат моноклональных антител против В-клеток окрелизумаб (Ocrelizumab), которые снижают частоту рецидивов РС у пациентов всех возрастных групп, причем первый снижает риск прогрессии инвалидности у пациентов до 40 лет, а второй делает то же самое у пациентов всех возрастных групп с преимуществом у пациентов моложе 40 лет;

- алемтузумаб (Alemtuzumab, Lemtrada);

- пегилированный интерферон- β (Pegylated interferon- β , Plegriby);

- даклизумаб (Daclizumab) – снижающие воспаление в тканях мозга гуманизированные антитела;

- интерферон- β -1a (Interferon- β -1a, Avonex) и глатирамер ацетат (Glatiramer acetate, Copaxone) – препараты первой линии терапии для ремиттирующей формы РС, снижающие частоту, тяжесть рецидивов и замедляющие прогрессирование неврологической инвалидности;

- финголимод (Fingolimod), не оказывающий положительного действия на снижение рецидивов и риск прогрессии инвалидности у пациентов старше 40 лет;

- натализумаб (Natalizumab), значительно снижающий частоту рецидивов РС в обеих группах при определенных условиях и снижающий риск прогрессии инвалидности только у пациентов до 40 лет;

- терифлуномид (Teriflunomide), снижающий частоту ежегодных рецидивов у пациентов всех возрастных групп и риск прогрессии инвалидности только у пациентов до 38 лет;

- озанимод (Ozanimod), не снижающий рецидивов у пациентов старше 40 лет и риск прогрессии инвалидности в обеих группах;

- кладрибин (Cladribine), снижающий активность заболевания РС и риск прогрессии инвалидности у пациентов в обеих группах;

- сипонимод (Siponimod), значительно снижающий риск прогрессии инвалидности у пациентов всех возрастных групп;

- офатумумаб (Ofatumumab), значительно снижающий частоту рецидивов РС и риск прогрессии инвалидности в группах молодых и возрастных пациентов.

Видно, что из перечисленных препаратов, согласно представленным данным [1, 3], по крайней мере, пять препаратов заслуживают внимания для применения у пожилых пациентов, среди которых с подтвержденным частичным положительным эффектом – окрелизумаб, натализумаб и сипонимод, и с полным положительным эффектом – кладрибин и офатумумаб. Более подробный список фармакологических препаратов, которые могут использоваться при терапии различных форм РС, и их доступность приводится в обзоре Хаузера и Кри [2]. Возможности применения части указанных препаратов, особенно новых, для ведения пожилых больных РС требуют изучения и накопления опыта.

В связи с распространением нового взгляда на иммуннопатологию РС, а именно, признанием участия не только Т-клеточного иммунитета, но и ключевой роли В-клеток в патогенезе заболевания, рекомендуется применение новых высокоэффективных иммуномодулирующих препаратов на ранних стадиях заболевания, которые, как правило, фиксируются у молодых пациентов [2]. Одной из основных проблем терапевтической помощи больным с РС пожилого возраста является неэффективность или малая эффективность подобных лекарственных препаратов у этой группы пациентов, что согласуется с данными, показывающими, что воспаление более выражено у молодых пациентов, и поэтому благоприятный эффект мощных противовоспалительных препаратов ослабевает с возрастом [54]. В связи с этим для ведения возрастных пациентов с РС была предложена стратегия деэскалации («деэскалация» – снижение интенсивности терапии за счет уменьшения дозировки и количества лекарств), что позволило избежать полного прекращения лечения и связанной с этим угрозы прогрессирования ухудшения состояния и неизбежной инвалидизации [3, 55]. В то же время подчеркивается, что этот подход остается неизученным и требует дальнейших исследований [55]. В целом, стратегия деэскалации

для возрастных пациентов с РС могла бы включать в качестве вариантов следующие элементы терапии: переход на менее эффективные фармакологические препараты, такие как терифлуноид, и препараты на основе интерферона или глатирамера ацетата; увеличение интервала между приемами таких препаратов, как натализумаб и проведением терапии, уничтожающей В-клетки; при лимфопении и положительной серологии JCV (вирус Джона Каннингема), вследствие применения препаратов натализумаб или финголимод, может быть рекомендован переход на другие методы лечения с использованием кладрибина или В-клеточной терапии [3]. Учитывая риск инфекций и сопутствующих заболеваний у пожилых людей с РС, длительно находящихся на терапии, решение о продолжении или прекращении терапии должно рассматриваться в каждом конкретном случае индивидуально [56, 57].

Следует отметить, что одним из характерных явлений, наблюдаемых при старении организма человека, является увеличение продукции АФК митохондриями [58]. Избыточная продукция АФК является одной из значимых причин многих нейродегенеративных заболеваний и ухудшения ментальных способностей у пожилых людей [59, 60], и также играет одну из ключевых ролей в развитии патологии РС [61]. Исследования последних лет на клеточных моделях РС и моделях РС у мышей (ЭАЭ-модель) показали, что МАО SkQ1 и MitoQ, обладающие мощными антиоксидантными свойствами, приводят к ремиелинизации поврежденных патологией миелиновых оболочек [62]. Кроме того, на модели болезни Паркинсона у мышей МАО Mito-Q частично восстанавливал нарушение нейрофункций и активность митохондриальной аконитазы [63]. Более полный перечень защитных и регенерирующих свойств МАО, значимых для восстановления нейрофункций, представлен в обзоре Фетисовой и соавт. [12]. Можно предположить, что наряду со стратегией деэскалации в комплексной терапии пожилых пациентов с РС в перспективе также будет полезно применение МАО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huang W.J., Chen W.W., Zhang X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp. Ther. Med.* 2017;13(6):3163–3166.
2. Hauser S.L., Cree B.A.C. Treatment of multiple sclerosis: A review. *Am. J. Med.* 2020;133(12):1380–1390.e2.
3. Macaron G., Larochelle C., Arbour N., Galmard M., Girard J.M., Prat A., Duquette P. Impact of aging on treatment considerations for multiple sclerosis patients. *Front. Neurol.* 2023;14:1197212.
4. Ostolaza A., Corroza J., Ayuso T. Multiple sclerosis and aging: comorbidity and treatment challenges. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2021;50:102815.

Заключение

За последние два десятилетия наметился существенный прогресс в понимании причин возникновения и подходах лечения РС. Использование достижений генетики, биохимии, молекулярной биологии и иммунологии приближают человечество к разгадке причин этого многофакторного тяжелого заболевания, которым страдают около 2,8 млн человек в мире. Перспективы применения новейших медицинских технологий с использованием стволовых клеток, таргетных технологий на основе целевых иммунопрепаратов и проникающих МАО дают пациентам шансы на достижение стойкой ремиссии и более высокого уровня в оказании медицинской помощи и, возможно, станут прологом избавления от столь тяжелого заболевания.

Мы посвящаем нашу работу светлой памяти выдающегося биохимика, нашего учителя и вдохновителя, Владимира Петровича Скулачева, с которым мы вместе работали много лет. В.П. Скулачев более полувека возглавлял НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова и отдел биоэнергетики в том же Институте, заложил основы и способствовал развитию биоэнергетики как науки. Как и многие поколения студентов и аспирантов, воспитанные В.П. Скулачевым, мы с благодарностью будем вспоминать этого замечательного человека. Мы выражаем искреннюю благодарность Максиму Владимировичу Скулачеву за ценные консультации в ходе подготовки рукописи.

Работа выполнена в рамках госзадания МГУ на госбюджетной основе (научные проекты №/№ 119121690043-3, 1243020800089-2, 121042600047-9). Авторы не имеют конфликта интересов в финансовой или каких-либо иных сферах деятельности. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием авторами животных в качестве объектов.

5. Zhang Y., Atkinson J., Burd C.E., Graves J., Segal B.M. Biological aging in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2023;29(14):1701–1708.
6. Zeydan B., Kantarci O.H. Impact of age on multiple sclerosis disease activity and progression. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2020;20(7):24.
7. Fetisova E., Vorobjeva N., Muntyan M. Multiple sclerosis. Some features of pathology and prospects for therapy. Part 1. *Adv. Gerontol.* 2024;14(2):35–48.
8. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.

9. De Bondt M., Hellings N., Opdenakker G., Struyf S. Neutrophils: underestimated players in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(12):4558.
10. Dhaiban S., Al-Ani M., Elemam N.M., Al-Aawad M.H., Al-Rawi Z., Maghazachi A.A. Role of peripheral immune cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 2021;3(1):12.
11. Grebenciucova E., Pruitt A. Infections in patients receiving multiple sclerosis disease-modifying therapies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017;17(11):88.
12. Fetisova E., Chernyak B., Korshunova G., Muntyan M., Skulachev V. Mitochondria-targeted antioxidants as a prospective therapeutic strategy for multiple sclerosis. *Curr. Med. Chem.* 2017;24(19):2086–2114.
13. Fetisova E.K., Muntyan M.S., Lyamzaev K.G., Chernyak B.V. Therapeutic effect of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on the culture model of multiple sclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019;2019:2082561.
14. Fock E.M., Parnova R.G. Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants against inflammatory response to lipopolysaccharide challenge: a review. *Pharmaceutics.* 2021;13(2):144.
15. Jiang Q., Yin J., Chen J., Ma X., Wu M., Liu G., Yao K., Tan B., Yin Y. Mitochondria-targeted antioxidants: a step towards disease treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020;2020:8837893.
16. Liberman E.A., Topaly V.P., Tsofina L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. Mechanism of coupling of oxidant phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. *Nature.* 1969;222(5198):1076–1078.
17. Korshunova G.A., Shishkina A.V., Skulachev M.V. Design, synthesis, and some aspects of the biological activity of mitochondria-targeted antioxidants. *Biochemistry (Mosc.).* 2017;82(7):760–777.
18. Fields M., Marcuzzi A., Gonelli A., Celeghini C., Maximova N., Rimondi E. Mitochondria-targeted antioxidants, an innovative class of antioxidant compounds for neurodegenerative diseases: perspectives and limitations. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(4):3739.
19. Skulachev V.P., Antonenko Y.N., Cherepanov D.A., et al. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs). *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenergetics.* 2010;1797(6–7):878–89.
20. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry (Mosc.).* 2008;73(12):1273–1287.
21. Murphy M.P., Smith R.A.J. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007;47(1):629–656.
22. Открытое исследование I фазы по изучению фармакокинетики, безопасности и переносимости препарата Пластомитин® при однократном приеме возрастающих доз у здоровых добровольцев. (Ответственный исследователь Щукин И.А.) [Электронный ресурс]. Государственный реестр лекарственных средств. 2016. Дата обновления: 15.12.2024. URL: <https://grlsbase.ru/clinicaltrails/clintrail/3570> (дата обращения: 15.12.2024).
23. Fassas A., Anagnostopoulos A., Kazis A., Kapinas K., Sakellari I., Kimiskidis V., Tsompanakou A. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transpl.* 1997;20(8):631–638.
24. Iacobaeus E., Kadri N., Lefsihane K., Boberg E., Gavin C., Törnqvist Andrén A., Lilja A., Brundin L., Blanc K.L. Short and long term clinical and immunologic follow up after bone marrow mesenchymal stromal cell therapy in progressive multiple sclerosis – a phase I study. *J. Clin. Med.* 2019;8(12):2102.
25. Федулов А.С., Борисов А.В., Зафранская М.М., Кривенко С.И., Марченко Л.Н., Качан Т.В., Московских Ю.В., Нижегородова Д.Б. Сравнительная оценка эффективности однократного и курсового применения аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в терапии рассеянного склероза. *ПМЖ. Медицинское обозрение.* 2019;3(4–2):54–58.
26. Bisaga G.N., Topuzova M.P., Malko V.A., Motorin D.V., Alekseeva Yu.A., Badaev R.S., Krinitsina T.V., Alekseeva T.M. High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis: intermediate results of 3 years research. *Russ. Neurol. J.* 2022;27(6):22–31.
27. Pluchino S., Quattrini A., Brambilla E., Gritti A., Salani G., Dina G., Galli R., Del Carro U., Amadio S., Bergami A., Furlan R., Comi G., Vescovi A.L., Martino G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature.* 2003;422(6933):688–694.
28. Genchi A., Brambilla E., Sangalli F., et al. Neural stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis: an open-label, phase 1 study. *Nat. Med.* 2023;29(1):75–85.
29. Uccelli A., Laroni A., Ali R., et al. Safety, tolerability, and activity of mesenchymal stem cells versus placebo in multiple sclerosis (MESEMS): a phase 2, randomised, double-blind crossover trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(11):917–929.
30. Сорокикова Т.В., Морозов А.М., Крюкова А.Н., Наумова С.А., Беляк М.А. Перспективы лечения прогрессирующих форм рассеянного склероза трансплантацией стволовых клеток (обзор литературы). *Вестник медицинского института «Реавиз». Реабилитация, врач и здоровье.* 2023;13(4):154–161.
31. Cecerska-Heryć E., Pekała M., Serwin N., Gliźniewicz M., Grygorcewicz B., Michalczyk A., Heryć R., Budkowska M., Dołęgowska B. The use of stem cells as a potential treatment method for selected neurodegenerative diseases: review. *Cell Mol. Neurobiol.* 2023;43(6):2643–2673.
32. Xie C., Liu Y.Q., Guan Y.T., Zhang G.X. Induced stem cells as a novel multiple sclerosis therapy. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2016;11(4):313–320.
33. Yun W., Choi K.A., Hwang I., et al. OCT4-induced oligodendrocyte progenitor cells promote remyelination and ameliorate disease. *NPJ Regen. Med.* 2022;7(1):4.
34. Wang Y., Chang K., Liu C., Na W., Jiang Z., Xiong J. Clemastine promotes oligodendrocyte precursor cell differentiation and myelination after acute radiation injury. *J. Radiat. Res. Radiat. Proces.* 2023;39(5):48–55.
35. Caverzasi E., Papinutto N., Cordano C., Kirish G., Gundel T.J., Zhu A., Akula A.V., Boscardin W.J., Neeb H., Henry R.G., Chan J.R., Green A.J. MWF of the corpus callosum is a robust measure of remyelination: Results from the ReBUILD trial. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2023;120(20):e2217635120.
36. Hansen C.S., Hasseldam H., Bacher I.H., Thamsborg S.M., Johansen F.F., Kringel H. *Trichuris suis*

secrete products that reduce disease severity in a multiple sclerosis model. *Acta Parasitol.* 2017;62(1):22–28.

37. Fleming J., Hernandez G., Hartman L., Maksimovic J., Nace S., Lawler B., Risa T., Cook T., Agni R., Reichelderfer M., Luzzio C., Rolak L., Field A., Fabry Z. Safety and efficacy of helminth treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of the HINT 2 clinical trial. *Mult. Scler. J.* 2019;25(1):81–91.

38. Yordanova I.A., Ebner F., Schulz A.R., Steinfelder S., Rosche B., Bolze A., Paul F., Mei H.E., Hartmann S. The worm-specific immune response in multiple sclerosis patients receiving controlled *Trichuris suis* ova immunotherapy. *Life (Basel).* 2021;11(2):101.

39. Libbey J.E., Cusick M.F., Fujinami R.S. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int. Rev. Immunol.* 2014;33(4):266–283.

40. Tanasescu R., Tench C.R., Constantinescu C.S., Telford G., Singh S., Frakich N., Onion D., Auer D.P., Gran B., Evangelou N., Falah Y., Ranshaw C., Cantacessi C., Jenkins T.P., Pritchard D.I. Hookworm treatment for relapsing multiple sclerosis: a randomized double-blinded placebo-controlled trial. *JAMA Neurol.* 2020;77(9):1089–1098.

41. Jenkins T.P., Pritchard D.I., Tanasescu R., Telford G., Papaikovou M., Scotti R., Cortés A., Constantinescu C.S., Cantacessi C. Experimental infection with the hookworm, *Necator americanus*, is associated with stable gut microbial diversity in human volunteers with relapsing multiple sclerosis. *BMC Biol.* 2021;19(1):74.

42. Wegener Parfrey L., Jirků M., Šíma R., Jalovecka M., Sak B., Grigore K., Jirků Pomajbíková K. A benign helminth alters the host immune system and the gut microbiota in a rat model system. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182205.

43. Calvani N.E.D., De Marco Verissimo C., Jewhurst H.L., Cwiklinski K., Flaus A., Dalton J.P. Two distinct superoxide dismutases (SOD) secreted by the helminth parasite *Fasciola hepatica* play roles in defence against metabolic and host immune cell-derived reactive oxygen species (ROS) during growth and development. *Antioxidants.* 2022;11(10):1968.

44. Otero L., Bonilla M., Protasio A.V., Fernández C., Gladyshev V.N., Salinas G. Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths. *BMC Genomics.* 2010;11:237.

45. Xiang C., Zhong G., Wang H. IL-9 plays a critical role in helminth-induced protection against COVID-19-related cytokine storms. *mBio.* 2024;15(7):e0122924.

46. Cao Z., Wang J., Liu X., Liu Y., Li F., Liu M., Chiu S., Jin X. Helminth alleviates COVID-19-related cytokine storm in an IL-9-dependent way. *mBio.* 2024;15(6):e00905–24.

47. Solaro C., Ponzio M., Moran E., Tanganelli P., Pizio R., Ribizzi G., Venturi S., Mancardi G.L., Battaglia M.A. The changing face of multiple sclerosis: Prevalence and incidence in an aging population. *Mult. Scler.* 2015;21(10):1244–1250.

48. Marrie R.A., Cohen J., Stuve O., Trojano M., Sørensen P.S., Reingold S., Cutter G., Reider N. A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: overview. *Mult. Scler.* 2015;21(3):263–281.

49. Noseworthy J., Paty D., Wonnacott T., Feasby T., Ebers G. Multiple sclerosis after age 50. *Neurology* 1983;33(12):1537–1537.

50. Minden S.L., Frankel D., Hadden L.S., Srinath K.P., Perloff J.N. Disability in elderly people with

multiple sclerosis: An analysis of baseline data from the Soniya Slifka Longitudinal Multiple Sclerosis Study. *NeuroRehabilitation.* 2004;19(1):55–67.

51. Zinganell A., Göbel G., Berek K., Hofer B., Asenbaum-Nan S., Barang M., Böck K., Bsteh C., Bsteh G., Eger S., Eggers C., Fertl E., Joldic D., Khalil M., Langenscheidt D. et al. Multiple sclerosis in the elderly: a retrospective cohort study. *J. Neurol.* 2024;271(2):674–687.

52. Weideman A.M., Tapia-Maltos M.A., Johnson K., Greenwood M., Bielekova B. Meta-analysis of the age-dependent efficacy of multiple sclerosis treatments. *Front. Neurol.* 2017;8:577.

53. Bjornevik K., Cortese M., Healy, B.C., Kuhle J., Mina M.J., Leng Y., Elledge S.J., Niebuhr D.W., Scher A.I., Munger K.L., Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science.* 2022;375(6578):296–301.

54. Matell H., Lycke J., Svenningsson A., Holmén C., Khademi M., Hillert J., Olsson T., Piehl F. Age-dependent effects on the treatment response of natalizumab in MS patients. *Mult. Scler.* 2015;21(1):48–56.

55. Gelibter S., Saraceno L., Pirro F., Susani E.L., Protti A. As time goes by: Treatment challenges in elderly people with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2024;391:578368.

56. Muñoz J.S., Santiago A.D., Escudero J.C., Merino J.A.G. Case report: Primary cytomegalovirus infection in a patient with late onset multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate. *Front. Neurol.* 2024;15:1363876.

57. Oudr N. Multiple sclerosis in elderly patients: When we can stopped treatment? *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2023;80:105181.

58. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., et al. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics.* 2009;1787(5):437–461.

59. Zielonka J., Joseph J., Sikora A., Hardy M., Ouari O., Vasquez-Vivar J., Cheng G., Lopez M., Kalyanaram B. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications. *Chem. Rev.* 2017;117(15):10043–10120.

60. Lin M.M., Liu N., Qin Z.H., Wang Y. Mitochondrial-derived damage-associated molecular patterns amplify neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 2022;43(10):2439–2447.

61. Sanabria-Castro A., Alape-Girón A., Flores-Díaz M., Echeverri-McCandless A., Parajeles-Vindas A. Oxidative stress involvement in the molecular pathogenesis and progression of multiple sclerosis: a literature review. *Rev. Neurosci.* 2024;35(3):355–371.

62. Sutter P.A., McKenna M.G., Imitola J., Pijewski R.S., Crocker S.J. Therapeutic opportunities for targeting cellular senescence in progressive multiple sclerosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2022;63:102184.

63. Ghosh A., Chandran K., Kalivendi S.V., Joseph J., Antholine W.E., Hillard C.J., Kanthasamy A., Kanthasamy A., Kalyanaram B. Neuroprotection by a mitochondria-targeted drug in a Parkinson's Disease model. *Free Radical Biol. Med.* 2010;49:1674–1684.

Поступила в редакцию 13.01.2024

После доработки 22.11.2024

Принята в печать 11.12.2024

REVIEW

Multiple sclerosis. Some features of pathology and prospects for therapy. Part 2

E.K. Fetisova¹ , N.V. Vorobjeva² , M.S. Muntyan^{1,*} 

¹*Belozersky Institute of Physico–Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–40 Leninskie Gory, Moscow, 1119991, Russia;*

²*Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia*

**e-mail: muntyan@genebee.msu.ru*

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common neurological diseases and the number of affected people is constantly growing worldwide. Untreated MS leads to disability of the most capable part of the young population, and in recent years it has been diagnosed increasingly in elderly patients as well. The second part of our review is devoted to the prospects of MS therapies currently under development. Mitochondria and the use of mitochondria-targeted antioxidants, neutrophils, as well as immune cells affected by pathology and other differentiated cells, which can be reprogrammed and replaced by healthy cells using stem cells, are considered as targets in MS treatment. Helminth therapy, accompanied by a shift in the composition of the microbiota of MS patients and the release of antioxidants in the tissues of the examined humans and model animals, may lead to immunomodulation and reduction of oxidative stress, providing significant attenuation of the disease. Approaches to the treatment of elderly MS patients are discussed.

Keywords: *multiple sclerosis, oxidative stress, reactive oxygen species, neutrophils, mitochondria-targeted antioxidants, stem cells, helminth therapy, aging*

Funding: This research was performed under the state assignment of Moscow State University, project numbers 119121690043-3, 1243020800089-2, 121042600047-9.

Сведения об авторах

Фетисова Елена Константиновна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела математических методов в биологии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-55-50; e-mail: ekfetisova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7305-8102>

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

Мунтян Мария Сергеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела биоэнергетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-53-60; e-mail: muntyan@genebee.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2332-5644>



Роль компонентов иммунного ответа первого и семнадцатого типов в развитии аллергических заболеваний дыхательной системы

Т.В. Миронова^{1,*} , А.Д. Таганович¹ , А.Г. Кадушкин¹ , В.В. Макаревич¹ ,
И.П. Шиловский² , М.Р. Хаитов²

¹Кафедра биологической химии, Белорусский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Республика Беларусь,
220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, д. 83;

²Институт иммунологии, Федеральное медико-биологическое агентство,
Российская Федерация, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

*e-mail: tomanis@mail.ru

В классическом представлении о механизмах развития аллергического воспаления ведущая роль отводится клеткам Th2 и их цитокинам. В настоящее время эта концепция подвергается переосмыслению, поскольку в ряде случаев воздействие на компоненты иммунного ответа второго типа не позволяет устранить аллергические симптомы. В то же время получены экспериментальные доказательства вовлечения в развитие аллергических заболеваний дыхательных путей, таких как бронхиальная астма и аллергический ринит, популяций лимфоцитов Th1 и Th17. Компоненты иммунного ответа первого типа, в частности IFN- γ , способствуют как противовоспалительным, так и провоспалительным процессам, регулируя степень выраженности иммунного ответа дыхательных путей на действие аллергена. Суммарный эффект, по всей вероятности, заключается в сдерживании его прогрессирования за счет подавления иммунного ответа второго типа. Компоненты иммунного ответа 17-го типа активируют широкий спектр эффекторных клеток, поддерживающих воспаление. Цитокины семейства IL-17 (IL-17A и IL-17F) стимулируют в эпителиальных клетках дыхательных путей синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, которые рекрутируют и активируют нейтрофилы. Полагают, что аналогичные механизмы обуславливают вовлечение Th17 в развитие аллергического воспаления дыхательных путей.

Ключевые слова: Т-хелперы первого типа, интерферон- γ , фактор некроза опухоли- α , Т-хелперы 17-го типа, цитокины семейства интерлейкина 17, хемокины, аллергическое воспаление

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-11

Введение

Аллергия дыхательных путей (респираторная аллергия) — группа заболеваний, обусловленная повышенной чувствительностью иммунной системы и органов дыхания к определенным аллергенам. Респираторная аллергия встречается в виде двух форм: аллергический ринит (АР) и бронхиальная астма (БА). При АР в качестве органа-мишени выступает слизистая оболочка полости носа, а при БА в патологический процесс вовлекаются бронхи.

АР является наиболее часто встречающейся формой аллергии. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 1 до 40% населения в разных странах страдают сезонным АР и от 1 до 18% — круглогодичным АР, при этом пик забо-

леваемости приходится на возраст от 18 до 24 лет [1, 2]. Его рассматривают в качестве фактора риска развития БА. Согласно статистическим данным, до 50% пациентов с АР имеют симптомы БА и свыше 80% пациентов с БА страдают АР [3].

Принято считать, что ведущая роль в формировании аллергических воспалительных реакций принадлежит врожденным лимфоидным клеткам второго типа (ILC2, group 2 innate lymphoid cells) и Th2-лимфоцитам (Th, T helper) адаптивного иммунного ответа. Однако в настоящее время классическое представление о механизмах развития аллергических заболеваний, связанное с дисбалансом Th1/Th2-лимфоцитов, подвергается переосмыслению. Это связано с открытием новых субпопуляций Т-хелперов. Понимание механизмов — путь

к созданию эффективных патогенетически направленных в своем действии препаратов, способных снизить выраженность аллергической реакции или предотвратить ее дальнейшее развитие.

Механизм и основные участники развития аллергического воспаления

Иммунный ответ любого типа инициируется в момент поглощения аллерген-представляющей клеткой (АПК) чужеродного для организма агента (молекулы, бактерии и др.). В качестве АПК чаще всего выступают дендритные клетки (ДК), но также это могут быть тканевые макрофаги или В-лимфоциты. В результате процессинга антигена на поверхности АПК появляется молекула главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex) II, связанная с антигенной детерминантой. Далее АПК должна найти Т-лимфоцит, Т-клеточный рецептор которого (TCR, T-cell receptor) будет комплементарен представленному антигену. После такого контакта наивный Т-лимфоцит (Th0) под влиянием цитокинов дифференцируется в один из типов Т-хелперов. В зависимости от набора цитокинов, действующих на Th0, могут образоваться субпопуляции Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, Th-reg и др. [4]. Разнообразие форм иммунного ответа достигается за счет активации дифференцированными Т-хелперами различных клеток-эффекторов. Так, ответ по Th1-типу связан с активацией макрофагов и выработкой интерферона- γ (IFN- γ , interferon γ). В ходе ответа по Th2-типу происходит активация В-лимфоцитов и образование большого количества антител. При преобладании Th17-типа иммунного ответа активируются нейтрофилы, эпителиальные клетки (ЭК) и синтез цитокинов семейства интерлейкина 17 (IL, interleukin) [5].

Первичный этап каскада молекулярных событий аллергического воспаления дыхательных путей регулируется сложным взаимодействием между ЭК и ДК. Первоначально ингаляционный аллерген проходит через ЭК слизистой оболочки носа. После активации эти клетки выделяют ряд хемокинов — в частности, CCL20 — способствующих рекрутированию незрелых ДК [6]. В этот период повышается активность деацетилазы гистонов, которая приводит к нарушению синтеза белков плотных контактов и, соответственно, к дисфункции эпителиального барьера [7].

Полагают, что именно эти изменения predisполагают к пагубному воздействию аллергена. Оно заключается в индуцированной гибели ЭК и высвобождении из них IL-33, а также секреции тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP, thymic stromal lymphopoietin) и IL-25 из ЭК. Эти цитокины стимулируют развитие проаллергических ДК второго типа (ДК-2), а также ILC2, которые совместно усиливают локальное аллергическое воспаление, опосредованное Th2. В эксперименте

было показано, что TSLP и IL-33 могут и напрямую активировать клетки Th2 [6, 8, 9].

Активированные Th2 и их цитокины, в частности IL-4, способствуют синтезу и секреции иммуноглобулина E (IgE, immunoglobulin E) из В-лимфоцитов. IgE связывается с высокоаффинным поверхностным рецептором тучных клеток (Fc ϵ R I), что приводит к активации и дегрануляции последних. Тучные клетки секретируют ряд медиаторов аллергии, включая воспалительные цитокины, гистамин, β -гексозаминидазу, хемокины и производные арахидоновой кислоты [10]. Это приводит к инфильтрации иммунокомпетентных клеток с последующим формированием острого или хронического воспаления в тканях носовой полости и отеком слизистой оболочки носа.

Баланс между ответами клеток Th1 и Th2, по всей вероятности, играет центральную роль в патогенезе аллергического воспаления дыхательных путей. Экспериментально показано, что цитокины Th2, такие как IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, играют решающую роль в инициации и усилении аллергического воспаления, в то время как цитокины Th1, такие как IFN- γ , как считается, предотвращают этот процесс [11].

Однако в последние годы было признано, что дисбаланс Th1/Th2 не полностью объясняет механизм развития аллергических заболеваний, а устранение этого дисбаланса не позволяет полностью контролировать аллергические симптомы [12]. Значит, должны существовать другие механизмы.

Каждый тип Th-клеток секретирует цитокины, регулирующие функциональную активность других типов. Так клетки Th1 и Th2 способны влиять друг на друга, что приводит к доминированию иммунного ответа первого или второго типа. Под действием реполяризующих сигналов клетки Th2 могут секретировать не свойственный им IFN- γ , а клетки Th1 и Th17 — IL-4 [13].

Оказалось, что баланс между клетками Th17 и Treg также может иметь важное значение в развитии аллергических заболеваний. В развитии аутоиммунных нарушений и хронического воспаления клетки Th17 и их эффекторные цитокины семейства IL-17 играют провоспалительную роль, тогда как клетки Treg — противовоспалительную, продуцируя IL-10 и трансформирующий фактор роста β (TGF β , transforming growth factor β) [12, 14].

Роль компонентов иммунного ответа первого и семнадцатого типа в развитии аллергического воспаления

Как известно, иммунный ответ первого типа характеризуется доминированием клеток Th1 и их медиаторов: IFN- γ , IL-2, фактора некроза опухоли- α (TNF- α , tumor necrosis factor α) и др. Из событий, определяющих развитие иммунного ответа по первому или второму типу, подчеркива-

ется значимость баланса IFN- γ и IL-4 (ключевого участника иммунного ответа, опосредованного Th2). IFN- γ совместно с IL-12 и IL-18 инициирует дифференцировку Th1 и таким образом ингибирует пролиферацию Th2 [15].

Помимо вышеназванных медиаторов клетки Th1 продуцируют IL-3, TNF- β , колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ), а также фактор транскрипции T-bet. После пролиферации Th1 мигрируют в места локализации антигена, а выделяемые ими медиаторы привлекают тканевые макрофаги и ДК, активируют их на захват антигенов, стимулируют их бактерицидную активность, способствуют активации и пролиферации Т-киллеров.

Кроме того, IFN- γ стимулирует активность Т- и В-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, нейтрофилов и натуральных киллеров (НК), усиливает экспрессию молекул МНС I и МНС II [15]. Вместе с T-bet он играет важную роль в подавлении Th2-опосредованного иммунного ответа в слизистой оболочке носа. T-bet связывает фактор транскрипции гена *GATA3*, тем самым инактивируя его. Продукт экспрессии этого гена способен индуцировать STAT6-зависимую дифференцировку клеток Th2, одновременно подавляя дифференцировку лимфоцитов Th1.

Помимо смещения дифференцировки навигных Т-клеток в сторону подтипа Th1, супрессивные эффекты IFN- γ опосредуются и другими механизмами, такими как ингибирование продукции цитокинов в Th2, IgE – в В-лимфоцитах, облегчение апоптоза Т-клеток и эозинофилов, замедление активации эозинофилов [10].

Эффекты, вызываемые Th1, опосредованы, в том числе, действием хемокинов из группы CXС (от англ. cysteine – amino acid – cysteine), особенно CXCL9, 10 и 11. Эти хемокины индуцируются IFN- γ и действуют на иммунные клетки, экспрессирующие рецептор CXCR3, в том числе и Th1 [13].

Иммунный ответ, развивающийся по Th17-типу, направлен на поддержание воспаления за счет выработки цитокинов семейства IL-17, которые воздействуют на ряд клеток-эффекторов, среди которых Т- и В-лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки, макрофаги и др.

Th17 функционируют в коже и слизистых оболочках, куда они мигрируют под влиянием хемокина CCL6. Основным цитокином, обеспечивающим дифференцировку Th17, является IL-23, синтезирующийся ДК, макрофагами и моноцитами. Экспрессия IL-23 в ДК индуцируется TSLP и угнетается IL-4 [16]. IL-23 опосредует синтез цитокинов семейства IL-17, оказывая регулирующее влияние на факторы транскрипции – белки STAT3, орфаный рецептор γ -2, связанный с рецептором ретиноевой кислоты (ROR γ -2), и ядерный фактор- κ B (NF- κ B) [4, 17]. Также на произ-

водство IL-17 влияет супрессор цитокиновых сигналов 3 (SOCS, suppressor of cytokine signaling proteins), который препятствует фосфорилированию белка STAT3 и его связыванию с промоторами соответствующих генов [18]. Альтернативный способ индукции синтеза цитокинов семейства IL-17 может осуществляться посредством TGF- β и IL-6 [4, 19].

Семейство IL-17 объединяет шесть цитокинов (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), IL-17F), а также пять рецепторов (IL-17R, IL-17RH1, IL-RL, IL-RD, IL-17RE). Все интерлейкины семейства имеют массу около 20–30 кДа, длину порядка 163–202 аминокислотных остатков, а также сходный участок первичной структуры с четырьмя остатками цистеина [19, 20].

Главным представителем семейства IL-17 является IL-17A. Это димерный гликопротеин, который синтезируется в различных иммунокомпетентных клетках, включая тучные клетки, нейтрофилы, макрофаги, ДК и НК. Гистамин и серотонин усиливают его продукцию. В кровяном русле IL-17A циркулирует в виде гомодимера или гетеродимера, включающего IL-17F. IL-17F проявляет наибольшую (50%) гомологию с IL-17A. Он может функционировать как независимо, так и совместно с IL-17A. IL-17A и IL-17A/F связываются с рецепторным комплексом, состоящим из субъединиц IL-17RA и IL-17RC. Это приводит к активации гена *ACT1*, который регулирует продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α и IL-8. Также индуцируется выработка ГМ-КСФ, хемокинов и металлопротеиназ [19, 21]. Все это обеспечивает рекрутирование, активацию и миграцию нейтрофилов, стимулирует образование в моноцитах периферической крови IL-1 β , TNF- α и IL-6.

Активируя эпителиальные клетки дыхательных путей, IL-17A стимулирует их на выработку провоспалительных цитокинов и хемокинов, усиливающих нейтрофильное воспаление. Однако IL-17A может также участвовать в гиперреактивности и структурном ремоделировании дыхательных путей, действуя непосредственно на клетки гладкой мускулатуры [22–24].

Представитель семейства IL-17E (IL-25), как частный случай, не относится к участникам иммунного ответа 17-го типа, поскольку он усиливает образование цитокинов группы Th2. Тем самым, он усиливает Th2-иммунный ответ, поскольку вызывает эозинофилию, повышает уровень сывороточных иммуноглобулинов Е и G1, а также синтез IL-4, IL-5 и IL-13 [19, 25]. Это сопровождается гиперплазией эпителиальных клеток, увеличением секреции слизи и образования в клетках провоспалительных цитокинов семейства Th2 [25].

IL-17D синтезируется в покоящихся Т-клетках CD4 $^{+}$ и стимулирует в эндотелиальных клетках продукцию IL-6, IL-8 и ГМ-КСФ. IL-17C образуется в эпителиальных клетках верхних и нижних

дыхательных путей и выполняет функцию медиатора врожденного иммунитета [20].

Основной представитель рецепторов для IL-17 — IL-17R, синтезируется клетками сосудистого эндотелия, Т- и В-клетками, фибробластами и др. В проведении сигнала в клетки от IL-17 после его взаимодействия с рецептором вовлечены фактор транскрипции 6, c-Jun N-терминальная киназа (JNK, c-Jun N-terminal kinases), МАП-киназы, активирующий протеин 1, NF- κ B, внеклеточная сигнальная киназа (ERK, extracellular signal-regulated kinase) и фосфотидилинозитол-3-киназа (PI3K, phosphoinositide 3-kinase) [19, 26].

В развитии иммунного ответа 17-го типа участвуют хемокины семейства CXС. Их основная роль заключается в привлечении и активации нейтрофилов [27]. Так, CXCL8 (IL-8) является основным цитокином, участвующим в привлечении нейтрофилов к месту повреждения или инфекции. Предполагают, что он может усиливать и миграцию эозинофилов через базальную мембрану путем высвобождения из нейтрофилов супероксид-аниона, матриксной металлопротеиназы (ММР)-9, лейкотриена В4 и фактора активации тромбоцитов [28].

Роль компонентов иммунного ответа первого и семнадцатого типа в развитии аллергических заболеваний дыхательной системы

У пациентов с тяжелой формой БА и в эксперименте был обнаружен высокий уровень цитокинов, синтезируемых лимфоцитами Th1. На экспериментальной модели БА было показано, что развитие таких характерных особенностей заболевания, как нейтрофильное и эозинофильное воспаление, может быть связано с наличием рецептора IFN- γ на тучных клетках. В этой модели активация тучных клеток с помощью IFN- γ (через IFN- γ R) приводила к повышенному производству цитокинов, характерных для иммунного ответа, опосредованного Th2 (IL-6, IL-13 и IL-33) тучными и другими клетками, способными продуцировать эти цитокины [17]. Было показано, что концентрация CXCL9, CXCL10 и CXCL11 значительно повышена в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) после провокации антигеном у пациентов с БА. Повышенный уровень CXCL9 и CXCL10 наблюдался и у детей с обострением БА. У пациентов с АР TNF- α вызывает назальную воспалительную реакцию, характеризующуюся экссудацией плазмы и активностью нейтрофилов через 24 ч после контакта с аллергеном [13].

Многие исследователи продемонстрировали взаимосвязь семейства IL-17 с АР и стероидорезистентной БА. Устойчивой к кортикостероидам оказалась та форма БА, которая, как правило, не связана с развитием иммунного ответа второго типа. Именно для этой разновидности БА характерно увеличение количества не эозинофилов, а нейтрофилов [29–31]. Именно у таких пациентов

в плазме крови и слизи бронхов уровень цитокинов семейства IL-17 (в частности IL-17A и IL-17F) был повышен и коррелировал с тяжестью клинических проявлений [29, 33]. С другой стороны, у мышей с нарушением синтеза IL-17 аллергические симптомы были менее выражены. В слизистой оболочке носа у этих животных наблюдалось снижение количества эозинофилов, а в крови был снижен уровень IgE [34].

У людей, предрасположенных к АР, при контакте с аллергеном в крови увеличивается количество Th17, а в слизистой оболочке носа — концентрация IL-17. При этом в сыворотке крови уровень IL-17 имел корреляционную связь с тяжестью АР [13]. Было показано, что IL-17 вызывает активацию Th2, накопление эозинофилов, нейтрофилов и выработку IgE при АР. При этом нейтрализация IL-17 заметно снижала симптомы АР, подавляя дифференцировку как Th17, так и Th2 [35].

При блокировании активности IL-17A и IL-17F у мышей с экспериментальной тяжелой БА экспрессия CXCL1 снижалась [36]. Эти данные свидетельствуют о том, что CXCL1 играет важную роль в развитии аллергического воспаления дыхательных путей, опосредованного нейтрофилами.

У пациентов с БА наблюдался повышенный уровень IL-8 в сыворотке крови по сравнению с пациентами с АР и контрольной группой [37]. В БАЛЖ пациентов с астмой уровень IL-8 также был повышен по сравнению со здоровыми людьми [28]. Повышенную концентрацию IL-8 обнаружили в образцах назальной биопсии пациентов с АР, хроническим синуситом и сопутствующими полипами носа [38]. А после провокационных тестов с аллергеном в носовой полости высокую концентрацию IL-8 обнаружили в слезной жидкости пациентов с АР [13].

Приведенные данные позволяют предположить, что активация системы иммунного ответа первого типа, направленная на регуляцию баланса Th1/Th2, а также ингибирование иммунного ответа 17-го типа могут стать новым направлением поиска терапевтических средств для лечения аллергических заболеваний дыхательной системы. Вещества с такими свойствами пока только изучаются в экспериментальных животных моделях АР и БА. В частности, апигенин и розувастатин усиливали дифференцировку Th1, повышая соотношение Th1/Th2 [10, 11], а введение кверцетина и антител, нейтрализующих IL-17A и IL-17F, приводило к снижению количества Th17, облегчая симптомы аллергического воспаления [14, 24, 36].

Заключение

Несмотря на то что ведущая роль в развитии аллергических заболеваний дыхательных путей отводится клеткам Th2 и цитокинам, относящимся к участникам иммунного ответа второго типа, Th1 и Th17 также вовлечены в процесс развития

аллергического воспаления. Th1 посредством их главного цитокина IFN- γ оказывают многоплановое действие при аллергии. Они способствуют как противовоспалительным, так и провоспалительным процессам, регулируя степень выраженности иммунного ответа дыхательных путей на действие аллергена. Суммарный эффект, по всей вероятности, заключается в сдерживании его прогрессирования.

Цитокины семейства Th1, в частности IFN- γ , подавляют иммунный ответ второго типа, угнетая пролиферацию Th2-лимфоцитов, их способность синтезировать цитокины и процессы, опосредованные действием этих цитокинов на эффекторные клетки. С другой стороны, IFN- γ , и еще один цитокин семейства Th1 – TNF- α – способствуют обострению аллергических заболеваний за счет активации нейтрофильных и эозинофильных лимфоцитов, опосредованной стимуляцией продукции хемокинов семейства CXС и провоспалительных цитокинов. Однако механизмы такого влияния требуют дальнейшего изучения.

Клетки Th17 и секретируемые ими цитокины семейства IL-17 активируют широкий спектр эффекторных клеток, вовлеченных в поддержание воспаления. В частности, IL-17A и IL-17F стимулируют в эпителиальных клетках дыхательных путей синтез провоспалительных цитокинов

(TNF- α , IL-1 β , IL-6) и хемокинов (CXCL1, CXCL8), которые рекрутируют и активируют нейтрофилы. Полагают, что аналогичные механизмы обуславливают вовлечение Th17 в развитие аллергического воспаления дыхательных путей.

В настоящее время лечение аллергических заболеваний дыхательных путей преимущественно направлено на подавление иммунного ответа второго типа посредством назначения антигистаминных и стероидных препаратов и не всегда оказывается эффективным [2, 9]. Приведенные в данном обзоре сведения относительно роли цитокинов семейств Th1 и Th17 в регуляции аллергического воспалительного процесса заболеваний дыхательных путей свидетельствует о том, что компоненты первой и 17-й систем иммунного ответа также целесообразно рассматривать в качестве потенциальных терапевтических мишеней. При этом действие терапевтических средств должно быть разнонаправленным: активация системы 1 и сдерживание системы 17.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-45-10031). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Знаменская Л.К., Шадчнева Н.А., Паневская Г.Н. Динамика заболеваемости аллергическим ринитом у взрослого населения Республики Крым в период с 2011 по 2015 гг. *Таврический медико-биологический вестник*. 2017;3(3):75–79.
2. Рязанцев С.В., Павлова С.С. Отражение современных концепций терапии при лечении аллергических заболеваний носа и околоносовых пазух. *Медицинский совет*. 2020;(6):78–84.
3. Азизова К.Ш., Абдурахманова Н.Р., Курбанов А.Г., Малакаева З.А., Давдиева А.А., Исмаилова Б.Н., Мирзаханов С.М., Мирзаханов А.М. Исследование коморбидности бронхиальной астмы и аллергического ринита у детей. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2023;1(127):1–4.
4. Chen X., Yue R., Li X., Ye W., Gu W., Guo X. Surfactant protein A modulates the activities of the JAK/STAT pathway in suppressing Th1 and Th17 polarization in murine OVA-induced allergic asthma. *Lab. Invest.* 2021;101(9):1176–1185.
5. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Денисенко Ю.К. Особенности содержания цитокинов Th1- и Th17-лимфоцитов у лиц с хронической обструктивной болезнью легких. *Медицинская иммунология*. 2016;18(3):287–290.
6. Drazdauskaitė G., Layhadi J.A., Shamji M.H. Mechanisms of allergen immunotherapy in allergic rhinitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2021;21:2.
7. Steelant B., Wawrzyniak P., Martens K., Jonckheere A.C., Pugin B., Schrijvers R., Bullens D.M., Vanoir-

- beek J.A., Krawczyk K., Dreher A., Akdis C.A., Hellings P.W., Blocking histone deacetylase activity as a novel target for epithelial barrier defects in patients with allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019;144(5):1242–1253.
8. Akasaki S., Matsushita K., Kato Y., Fukuoka A., Iwasaki N., Nakahira M., Fujieda S., Yasuda K., Yoshimoto T. Murine allergic rhinitis and nasal Th₂ activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. *Int. Immunol.* 2016;28(2):65–76.
9. Новик Г.А., Тамразова О.Б. Практический подход к лечению аллергических заболеваний. *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2023;(3):5–15.
10. Chen F., He D., Yan B. Apigenin attenuates allergic responses of ovalbumin-induced allergic rhinitis through modulation of Th1/Th2 responses in experimental mice. *Dose-Response*. 2020;18(1):1559325820904799.
11. Saadat S., Mohamadian Roshan N., Aslani M.R., Boskabady M.H. Rosuvastatin suppresses cytokine production and lung inflammation in asthmatic, hyperlipidemic and asthmatic-hyperlipidemic rat models. *Cytokine*. 2020;128:154993.
12. Tao B., Ruan G., Wang D., Li Y., Wang Z., Yin G. Imbalance of peripheral Th17 and regulatory T cells in children with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* 2015;14(3):273–279.
13. Berghi N.O., Dumitru M., Vrinceanu D., Ciuluvica R.C., Simioniuc-Petrescu A., Caragheorghopol R., Tucureanu C., Cornateanu R. S., Giurcaneanu C. Relationship between chemokines and T lymphocytes in the context

of respiratory allergies (Review). *Exp. Ther. Med.* 2020;20(3):2352–2360.

14. Ke X., Chen Z., Wang X., Kang H., Hong S. Quercetin improves the imbalance of Th1/Th2 cells and Treg/Th17 cells to attenuate allergic rhinitis. *Autoimmunity*. 2023;56(1):2189133.

15. Просекова Е.В., Долгополов М.С., Сабыныч В.А. Полиморфизм генов, спонтанная и индуцированная продукция клетками периферической крови интерлейкина 4 и интерферона гамма при бронхиальной астме у детей. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2020;4(1):10–14.

16. Volpe E., Pattarini L., Martinez-Cingolani C., et al. Thymic stromal lymphopoietin links keratinocytes and dendritic cell-derived IL-23 in patients with psoriasis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;134(2):373–381.

17. Berker M., Frank L.J., Geßner A.L., Grassl N., Holtermann A.V., Höppner S., Kraef C., Leclaire M.D., Maier P., Messerer D.A.C., Möhrmann L., Nieke J.P., Schoch D., Soll D., Woopen C.M.P. Allergies – A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm. *Clin. Immunol.* 2017;174:73–83.

18. Ding F.M., Liao R.M., Chen Y.Q., Xie G.G., Zhang P.Y., Shao P., Zhang M. Upregulation of SOCS3 in lung CD4⁺ T cells in a mouse model of chronic PA lung infection and suppression of Th17-mediated neutrophil recruitment in exogenous SOCS3 transfer *in vitro*. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(1):778–786.

19. Просекова Е.В., Турянская А.И., Долгополов М.С. Семейство интерлейкина-17 при атопии и аллергических заболеваниях. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018;(2(72)):15–20.

20. Min H.J., Kim K.S. IL-17C expression and its correlation with pediatric adenoids: a preliminary study. *Int. J. Med. Sci.* 2020;17(17):2603–2610.

21. Cauli A., Piga M., Floris A., Mathieu A. Current perspective on the role of the interleukin-23/interleukin-17 axis in inflammation and disease (chronic arthritis and psoriasis). *Immunotargets Ther.* 2015;4:185–190.

22. Rahmawati S.F., Vos R., Bos I.S.T., Kerstjens H.A.M., Kistemaker L.E.M., Gosens R. Function-specific IL-17A and dexamethasone interactions in primary human airway epithelial cells. *Sci. Rep.* 2022;12(1):11110.

23. Willis C.R., Siegel L., Leith A., Mohn D., Escobar S., Wannberg S., Misura K., Rickel E., Rottman J.B., Comeau M.R., Sullivan J.K., Metz D.P., Tocker J., Budelsky A.L. IL-17RA signaling in airway inflammation and bronchial hyperreactivity in allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015;53(6):810–821.

24. Menson K.E., Mank M.M., Reed L.F., Van Der Vliet K.E., Ather J.L., Chapman D.G., Smith B.J., Rincon M., Poynter M.E. Therapeutic efficacy of IL-17A neutralization with corticosteroid treatment in a model of antigen-driven mixed-granulocytic asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2020;319(4):L693–L709.

25. Порошина А.С., Шершакова Н.Н., Шиловский И.П., Кадушкин А.Г., Таганович А.Д., Гудима Г.О., Хаитов М.Р. Роль ИЛ-25, ИЛ-33 и TSLP в развитии кортикостероидной резистентности. *Иммунология*. 2023;44(4):500–510.

26. Khantakova J.N., Mutovina A., Ayriyants K.A., Bondar N.P. Th17 cells, glucocorticoid resistance, and depression. *Cells*. 2023;12(23):2749.

27. Sawant K.V., Poluri K.M., Dutta A.K., Sepuru K.M., Troshkina A., Garofalo R.P., Rajarathnam K. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci. Rep.* 2016;6:33123.

28. Yang T., Li Y., Lyu Z., Huang K., Corrigan C. J., Ying S., Wang W., Wang, C. Characteristics of proinflammatory cytokines and chemokines in airways of asthmatics: relationships with disease severity and infiltration of inflammatory cells *Chin. Med. J.* 2017;130(17):2033–2040.

29. Симбирцев А.С. Цитокины в иммунопатогенезе аллергии. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2021;5(1):32–37.

30. Schiffer M., Peters K., Peters M. Comparison of airway remodeling in two different endotypes of allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2022;183(7):714–725.

31. Nadeem A., Ahmad S.F., Al-Harbi N.O., Ibrahim K.E., Siddiqui N., Al-Harbi M.M., Attia S.M., Bakheet S.A. Inhibition of Bruton's tyrosine kinase and IL-2 inducible T-cell kinase suppresses both neutrophilic and eosinophilic airway inflammation in a cockroach allergen extract-induced mixed granulocytic mouse model of asthma using preventative and therapeutic strategy. *Pharmacol. Res.* 2019;148:104441.

32. Sorbello V., Ciprandi G., Di Stefano A., Massaglia G.M., Favatà G., Conticello S., Malerba M., Folkerts G., Profita M., Rolla G., Ricciardolo F.L. Nasal IL-17F is related to bronchial IL-17F/neutrophilia and exacerbations in stable atopic severe asthma. *Allergy*. 2015;70(2):236–240.

33. Song J., Zhang H., Tong Y., Wang Y., Xiang Q., Dai H., Weng C., Wang L., Fan J., Shuai Y., Lai C., Fang X., Chen M., Bao J., Zhang W. Molecular mechanism of interleukin-17A regulating airway epithelial cell ferroptosis based on allergic asthma airway inflammation. *Redox Biol.* 2023;68:102970.

34. Quan S.H., Zhang Y.L., Han D.H., Iwakura Y., Rhee C.S. Contribution of interleukin 17A to the development and regulation of allergic inflammation in a murine allergic rhinitis model. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2012;108(5):342–350.

35. Xu B., Liu X., Gao S. IL2-inducible T-cell kinase inhibitor ibrutinib reduces symptoms and Th2 differentiation in mouse allergic-rhinitis model. *Drug. Dev. Res.* 2022;83(2):544–551.

36. Chenuet P., Fauconnier L., Madouri F., Marchiol T., Rouxel N., Ledru A., Mauny P., Lory R., Uttenhove C., Snick J., Iwakura Y., Padova F., Quesniaux V., Togbe D., Ryffel B. Neutralization of either IL-17A or IL-17F is sufficient to inhibit house dust mite induced allergic asthma in mice. *Clin. Sci. (Lond.)*. 2017;131(20):2533–2548.

37. Lee M.F., Song P.P., Hwang G.Y., Lin S.J., Chen Y.H. Sensitization to Per a 2 of the American cockroach correlates with more clinical severity among airway allergic patients in Taiwan. *Ann. Allerg. Asthma Immunol.* 2012;108(4):243–248.

38. Wang X., Zhang N., Bo M., Holtappels G., Zheng M., Lou H., Wang H., Zhang L., Bachert C. Diversity of Th cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016;138(5):1344–1353.

Поступила в редакцию 21.05.2024

После доработки 12.09.2024

Принята в печать 18.12.2024

REVIEW

The role of immune response components of the first and seventeenth types in the development of allergic diseases of the respiratory system

T.V. Mironova^{1, *} , A.D. Tahanovich¹ , A.G. Kadushkin¹ , V.V. Makarevich¹ ,
I.P. Shilovskiy² , M.R. Khaitov² 

¹Department of Biochemistry, Belarusian State Medical University, Ministry of Health of the Republic of Belarus, Dzerzhinski Ave., 83, Minsk, 220083, Republic of Belarus;

²National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, Kashirskoe shosse, 24, Moscow, 115522, Russian Federation

*e-mail: tomanis@mail.ru

In the classical view of the mechanisms of development of allergic inflammation, the leading role is given to Th2 cells and their cytokines. Currently, this concept is being rethought, since in some cases, influencing the components of the second type of immune response does not eliminate allergic symptoms. At the same time, experimental evidence has been obtained of the involvement of Th1 and Th17 lymphocyte populations in the development of allergic diseases of the respiratory tract, such as bronchial asthma and allergic rhinitis. Components of the type 1 immune response, in particular IFN- γ , promote both anti-inflammatory and pro-inflammatory processes, regulating the severity of the immune response of the respiratory tract to the action of the allergen. The net effect is likely to be to inhibit its progression by suppressing the type 2 immune response. Components of the type 17 immune response activate a wide range of effector cells that support inflammation. Cytokines of the IL-17 family (IL-17A and IL-17F) stimulate the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in airway epithelial cells, which recruit and activate neutrophils. It is assumed that similar mechanisms determine the involvement of Th17 in the development of allergic airway inflammation.

Keywords: *T-helper cells type 1, interferon- γ , tumor necrosis factor- α , T-helper cells type 17, interleukin 17 family cytokines, chemokines, allergic inflammation*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-45-10031.

Сведения об авторах

Миронова Татьяна Витальевна – асс. кафедры биологической химии УО «БГМУ» Минздрава Республики Беларусь. Тел.: 8044-733-65-88; e-mail: tomanis@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-9884-1639>

Таганович Анатолий Дмитриевич – докт. мед. наук, проф., зав. кафедрой биологической химии УО «БГМУ» Минздрава Республики Беларусь. Тел.: 8044-780-75-62; e-mail: taganovich@bsmu.by; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>

Кадушкин Алексей Геннадьевич – докт. мед. наук, доц. кафедры биологической химии УО «БГМУ» Минздрава Республики Беларусь. Тел.: 8029-798-15-50; e-mail: kadushkyn@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1620-8477>

Макаревич Василина Вадимовна – асс. кафедры биологической химии УО «БГМУ» Минздрава Республики Беларусь. Тел.: 8033-380-05-11; e-mail: vasilinamkrvch@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-7623-8839>

Шиловский Игорь Петрович – докт. биол. наук, зам. директора по науке и инновациям ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Тел.: 8-499-311-67-78; e-mail: ip.shilovsky@nrcii.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5343-4230>

Хайтов Муса Рахимович – член-корр. РАН, докт. мед. наук, проф., директор ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; зав. кафедрой иммунологии МБФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Тел.: 8-499-617-10-27; e-mail: mr.khaitov@nrcii.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК (575.1/571.27)

Взаимодействующие гены *PARG1* и *EXA1* являются важными регуляторами аутоиммунитета у растений**Е.В. Куприянова^{1, *} , К.А. Манахова², Т.А. Ежова¹** ¹Кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет Сириус, Россия, 354340, Краснодарский край, пгт Сириус

*e-mail: ekupriyanova@gmail.com

Исследования выполнены на растениях двойного мутанта резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) *parg1 exa1*, характеризующегося смертью клеток по краю листовой пластинки, активацией экспрессии генов иммунных рецепторов, генов PR-белков и генов гиперчувствительного ответа, что является признаком аутоиммунитета. В то же время, в отличие от других мутантов с проявлением аутоиммунитета, мутант *parg1 exa1* демонстрировал приобретение клетками листа плюрипотентности и способность к регенерации нового края листа. В связи с необычным фенотипом в данной работе проведен углубленный анализ транскриптома молодых листьев мутанта и растений дикого типа. У мутанта обнаружено повышение уровня экспрессии всех основных компонентов иммунного ответа, включая гены Ca^{2+} -проводящих каналов, НАДФН-оксидаз, генов синтеза салициловой кислоты, жасмоновой кислоты и многие другие. Полученные данные свидетельствуют о том, что гены *PARG1* и *EXA1*, контролирующие уровень поли(АДФ-рибозилирования) и процесс нонсенс-опосредованной деградации РНК соответственно, являются важными регуляторами иммунного ответа. Их функция необходима для предотвращения чрезмерной активации защитных систем в растениях.

Ключевые слова: аутоиммунитет растений, транскриптом, рецепторы иммунитета, салициловая кислота, клеточная смерть, мутации

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-8

Список сокращений:

CBL – calcineurine B-like proteins (кальциневрин В-подобные белки);
CLM – calmodulin (кальмодулин);
CML – calmoduline-like proteins (кальмодулин-подобных белков);
EDS1 – enhanced disease susceptibility 1 (белок повышенной восприимчивости к болезням 1);
GLR – glutamate-receptor-like proteins (белки, подобный рецептору глутамата);
GO – gene ontology (генная онтология);
NLR – nucleotide binding and leucine rich-repeat (нуклеотид-связывающий лейцин-богатый белок);

PAD4 – phytoalexin deficient 4 (дефицит фитоалексинов 4);
PARP – poly(ADP-ribose) polymerase (поли(АДФ-рибоза)-полимераза);
PRR – pattern-recognition receptors (рецепторы опознавания паттерна);
АФК – активные формы кислорода;
ДТ – дикий тип;
ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены;
ЖК – жасмоновая кислота;
ИО – иммунный ответ;
СК – салициловая кислота;
ТФ – транскрипционные факторы.

Введение

Растения выработали разнообразные защитные механизмы от биотических стрессовых воздействий. Для распознавания патогена и запуска защитного ответа растения используют иммунные рецепторы: мембранные рецепторы PRR (Pattern-Recognition Receptors) и ядерно-цитоплазматические нуклеотид-связывающие рецепторы NLR (Nucleotide binding and Leucine rich-Repeat). Рецепторы PRR распознают консервативные молекулярные паттерны патогенов и поврежденных растительных клеток, инициируя быстрый неспецифический защитный ответ [1, 2]. Внутриклеточные рецепторы NLR распознают расоспецифические эффекторы патогенов и активируются позже, чем PRR-рецепторы [3]. Составной частью специфического иммунного ответа (ИО), вызванного активацией NLR, является клеточная смерть в области поражения, которая ограничивает распространение и вызывает гибель патогена. Этот локализованный «гиперчувствительный ответ» обеспечивает полную устойчивость к определенным расам патогенов [4, 5].

Несмотря на различия во времени проявления и силе ИО, который запускается рецепторами PRR и NLR, начальные этапы ИО очень похожи. После связывания рецепторов с лигандами наблюдается увеличение в цитоплазме концентрации Ca^{2+} и активных форм кислорода (АФК). Эти два быстрых ответа обусловлены активацией белков Ca^{2+} -проницаемых каналов и НАДФН-оксидаз соответственно, локализованных на внешней мембране клетки [6]. К каноническим Ca^{2+} -каналам относятся CNGC – каналы, активируемые циклическими нуклеотидами, GLR – ионотропные глутаматные рецепторы, каналы ANN, образованные аннексинами, каналы MLO и некоторые другие [7, 8]. Быстрое, но временное открытие канонических Ca^{2+} -проницаемых каналов наблюдается практически сразу после активации рецепторов PRR.

Неканонические Ca^{2+} -каналы обеспечивают вторую волну поступления Ca^{2+} в клетки. Эти каналы создаются путем олигомеризации самих NLR-рецепторов. Это показано для NLR-рецептора ZAR1 резуховидки, который образует пентамер, пронизывающий мембрану [9], а также для NLR-белков резуховидки NRG1 и ADR1 после получения ими информации от других рецепторов NLR [10]. Результатом поступления Ca^{2+} в клетку является активация белков – сенсоров Ca^{2+} : кальмодулинов и кальмодулин-подобных белков, кальциневрин В-подобных белков (CBL, calcineurine B-like proteins) и протеинкиназ, взаимодействующих с CBL [11]. Сенсоры Ca^{2+} способны активировать некоторые белки Ca^{2+} -каналов, PRR- и NLR-рецепторы, транскрипционные факторы (ТФ) и ферменты (например, некоторые ме-

такаспазы), а также другие белки, что приводит к усилению и дальнейшему развитию ИО [12, 13].

Ca^{2+} -связывающие домены найдены и у белка RBOHD, который является основной субъединицей комплекса НАДФН-оксидазы, продуцирующего АФК [14]. Образующиеся АФК также могут влиять на состояние многих редокс-чувствительных белков: некоторых цистеин-богатых рецепторных киназ CRK [15], протеинкиназ, передающих информацию о появлении АФК на другие белки-мишени [16], ТФ с редокс-зависимой активностью [17, 18] и др. АФК могут влиять на вход Ca^{2+} в цитозоль, активируя аннексины [19]. Активация двух быстрых ИО (поступление Ca^{2+} и образование АФК), которая поддерживается механизмом позитивной обратной связи, приводит к существенному перепрограммированию генной экспрессии, необходимой для уничтожения патогенов [6].

Салициловая кислота (СК) и белки семейства EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1) – центральные компоненты ИО, экспрессия которых зависит от содержания Ca^{2+} в цитозоле. Белки-сенсоры Ca^{2+} активируют кальмодулин-связывающий ТФ CBP60g, который вместе с ТФ SARD1 повышает транскрипцию как генов синтеза СК, так и генов семейства EDS1 [20]. Сигнальные пути СК и белков семейства EDS1 действуют параллельно и выполняют роль сигнальных промежуточных компонентов между распознаванием патогенов и осуществлением как неспецифического, так и специфического ИО.

Небольшое семейство EDS1-липазоподобных белков, специфичных для растений, кодируется генами *EDS1*, *PAD4*, *SAG101*, которые образуют комплексы EDS1–PAD4 и EDS1–SAG101. Белковый комплекс EDS1–PAD4, взаимодействуя с ТФ, может повышать транскрипцию генов *ICS1* и *PBS3*, контролирующих биосинтез СК [21, 22], что активирует сигнальный путь СК. Однако белки семейства EDS1 могут действовать независимо от пути СК. Гетеродимеры EDS1–SAG101 или EDS1–PAD4 могут активировать образование олигомерных комплексов белками NLR (NRG1 или ADR1 соответственно), которые, взаимодействуя с мембранами, образуют новые неканонические Ca^{2+} каналы [23].

Путь СК взаимодействует не только с Ca^{2+} -сигналингом, но и с АФК-сигнальным путем. Сигнальный путь СК активирует накопление АФК, влияя на транскрипцию генов *RBOH* НАДФН-оксидаз. Кроме того, СК может индуцировать накопление H_2O_2 , подавляя экспрессию каталаз и пероксидаз [24]. Сигнальный путь СК активирует транскрипцию целого ряда генов, специфических именно для этого гормона: генов ТФ семейств WRKY, ZIP, NAC, генов рецепторов NLR и PRR, генов *PR1*, *PR2* и *PR5*, кодирующих патогенез-ассоциированные белки [25]. СК считается важным

компонентом, инициирующим клеточную смерть, хотя точные механизмы этого влияния пока не выяснены [26]. Неотъемлемым компонентом клеточной смерти являются протеазы — метакаспазы, ферменты вакуолярного процессинга и цистеиновые протеазы [27]. Некоторые протеазы индуцируются СК [28].

Другим важнейшим защитным гормоном является жасмоновая кислота (ЖК). В отличие от СК, защищающей растения от биотрофов, ЖК необходима для защиты от некротрофов и насекомых. Между сигнальными путями ЖК и СК существуют сложные, часто антагонистические, взаимоотношения, что позволяет выбирать оптимальную линию защиты [29]. Среди мишеней есть группы генов, специфичные именно для ЖК: гены ответа на поранение, гены вторичного метаболизма, включая метаболизм глюкозинолатов и флавоноидов и пр. [25].

Среди мишеней ЖК и СК есть гены, которые активируются обоими гормонами или регулируются ими противоположным образом. Так, уровень транскрипции многих генов рецепторов NLR и PRR повышался при воздействии СК, но снижался при действии ЖК [25]. То же показано для генов *PAD4*, *EDS1*, *SAG101*, *ICS1*, *CBP60G* и *SARD1*, которые важны для накопления высокого уровня СК [30, 25]. Таким образом, ЖК может ослаблять ИО, индуцированный СК, путем ингибирования накопления СК и подавления генов-мишеней СК. Однако сигнальные пути могут действовать и совместно [31].

Продукция АФК, защитных белков, перестройка метаболизма и клеточная смерть приводят к прекращению роста и развития растений. Поэтому, наряду с генами, активирующими защитную реакцию на стрессовые воздействия, существуют негативные регуляторы ИО, поддерживающие баланс между развитием и защитным ответом [32]. Мутации в негативных регуляторах ИО, как и мутации, вызывающие эктопическую экспрессию позитивных регуляторов ИО, приводят к аутоиммунитету. Для аутоиммунных мутантов характерны накопление СК и АФК, а также реакции гиперчувствительности в отсутствие патогенов, существенное угнетение роста и даже летальность [32, 33].

В коллекции мутантов резуховидки кафедры генетики МГУ есть мутант *tae*, у которого обнаружены признаки проявления аутоиммунитета — смерть клеток листа, активация транскрипции генов иммунных рецепторов, генов PR-белков и генов гиперчувствительного ответа [34]. Вместе с тем, фенотип мутанта отличается от фенотипов ранее описанных аутоиммунных мутантов. У нашего мутанта более узкие листья, чем у дикого типа (ДТ). На поздних стадиях развития листа клетки реактивируют экспрессию генов плюрипотентности, образуют почки и лопасти [35], что никогда не

наблюдалось у других аутоиммунных мутантов. Генетическое картирование с использованием секвенирования показало, что фенотип обусловлен одновременным присутствием двух мутаций *parg1* и *exa1* в гомозиготном состоянии.

Ген *PARG1* кодирует гликогидролазу поли(АДФ-рибозы), которая синтезируется белками PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимераза, poly(ADP-ribose) polymerase). Высокий уровень поли(АДФ-рибозы) растение может распознать как сигнал стресса [36–39]. Снижая уровень поли(АДФ-рибозы), ген *PARG1* уменьшает стрессовый сигнал и способствует выживанию клеток в условиях генотоксического стресса [39]. Ген *EXA1* участвует в нонсенс-опосредованном распаде мРНК [40], ограничивает трансляцию мРНК иммунных рецепторов, взаимодействуя с фактором eIF4E инициации трансляции, подавляет клеточную смерть при атаке патогенов [40, 41].

Целью данной работы был детальный анализ экспрессии основных компонентов ИО для подтверждения проявления аутоиммунитета у двойного мутанта. Мы осуществили поиск в транскриптоме дополнительных групп генов, кодирующих иммунные рецепторы, генов, участвующих в Ca^{2+} -сигналинге и продукции АФК, генов, контролирующих синтез СК и ответ на этот стрессовый гормон, а также некоторых других групп генов, играющих важную роль в ИО. Наши исследования подтвердили, что мутант проявляет мощный аутоиммунитет, что позволяет утверждать, что гены *PARG1* и *EXA1* являются важными негативными регуляторами ИО.

Материалы и методы

Использованы данные секвенирования РНК, выделенной из молодых листьев растений резуховидки (*Arabidopsis thaliana*) мутанта *tae* и экотипа Blanes (линия К-6, исходная для получения мутанта) из коллекции кафедры генетики МГУ. О методах выделения РНК (по четыре биологических повторности для мутанта и ДТ), секвенирования на платформе Illumina NextSeq (Illumina, США) и сборке транскриптома мы сообщали ранее [34]. Наборы данных, созданные в ходе исследования и использованные в данной работе, депонированы в NCBI SRA и доступны через BioProject (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA926955>).

Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета DESeq2. Гены с более чем двукратным изменением экспрессии Log2FC (FC — fold change, отражает кратность изменения содержания РНК в растениях мутанта по сравнению с диким типом) и р-значением с поправкой на FDR (Padj) менее 0,05 (Benjamini and Hochberg's метод) были определены как дифференциально экспрессирующиеся (ДЭГ). Список ДЭГ, содержащий 3551 ген, использован в данной работе для анализа функционального обогащения с использованием

биоинформационного ресурса AgriGO v2.0 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>), который создан специально для углубленного анализа транскриптомов растений [42].

Для визуализации результатов исследований использованы возможности ресурса SRplot (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) и BioRender (<https://app.biorender.com/illustrations/>).

Результаты

Анализ генов иммунных рецепторов. Ранее мы сообщали об активации у мутанта 92 генов рецепторных белков, среди которых как гены мембранных PRR-рецепторов (20 генов цистеиновых рецептор-подобных киназ CLK и 16 генов рецептор-подобных белков RLP), так и 56 генов разнообразных рецепторов NLR [34]. Детальный анализ транскриптома, проведенный в данной работе, позволил дополнить список иммунных рецепторов PRR, транскрипция которых повышена у мутанта (рис. 1; табл. 1 приложения). Это 25 генов рецепторных киназ с лектиновым доменом (LecRK), которые распознают различные углеводы и участвуют в защите от биотических и абиотических стрессов [43, 44], 10 генов протеинкиназ (4 гена WAK и 6 генов WAKL), контролирующих растяжение клеток и ответ на стрессовые воздействия [45, 46], а также два гена рецепторов фитогормонов PEPR1 и PEPR2, которые активируются небольшими пептидами растительного происхождения, появляющимися в клетках после их повреждения [47].

Выявлено также несколько активированных генов, кодирующих малоисследованные группы RLK-рецепторов: три гена пролин-богатых рецепторных киназ PERK, два гена рецепторных киназ с двумя внеклеточными доменами (LRR и MAL), которые активируются олигосахаридами и рассматриваются как сенсоры целостности клеточных

стенок [48, 49], и три гена *LYK*, кодирующие рецептор-подобные киназы с лизиновыми мотивами LysM, которые распознают хитин [50]. Обнаружены также два гена *CCR*, кодирующие рецепторы с повторами CRINKLY4, и один ген для малектиновых рецепторов MLR, лиганды для которых еще не найдены [51, 52]. Среди генов, транскрипция которых у мутанта снижена по сравнению с ДТ, выявлено только три гена иммунных PRR-лектиновых рецепторов LecRK.

Анализ генов Ca^{2+} -проводящих каналов и генов, кодирующих сенсоры Ca^{2+} . Поскольку кальциевый сигналинг является первым быстрым ответом на активацию рецепторов, мы исследовали наличие генов Ca^{2+} -каналов среди ДЭГ. Наиболее представленными транспортерами Ca^{2+} оказались рецепторы глутамата GLR (glutamate-receptor-like proteins), которые считают основными регуляторами баланса между защитным ответом и процессами регенерации [53]. В листьях мутанта 8 генов GLR повышают уровень транскрипции (рис. 2А). Обнаружено повышение уровня транскрипции пяти генов MLO, кодирующих специфичные для растений белки Ca^{2+} -проводящих каналов с семью трансмембранными доменами [54].

Среди активированных у мутанта ДЭГ обнаружены также гены Ca^{2+} -каналов, гомологи которых выполняют ту же функцию у животных. Это три гена, кодирующие Ca^{2+} -каналы CNGC-класса, а также один ген аннексинов *ANN1*, экспрессия которого регулируется СК [55]. Обнаружена также активация пяти генов *ACA* Ca^{2+} -проводящих каналов (от Autoinhibited Ca^{2+} -ATPases) и двух генов *CAX* (Ca^{2+} exchangers), кодирующих белки каналов, локализованных на мембранах вакуолей и способствующих снижению содержания Ca^{2+} в цитозоле для поддержания гомеостаза его уровня [56]. Среди репрессированных генов Ca^{2+} -проводящих каналов найден лишь один ген *MLO13* (рис. 2А).

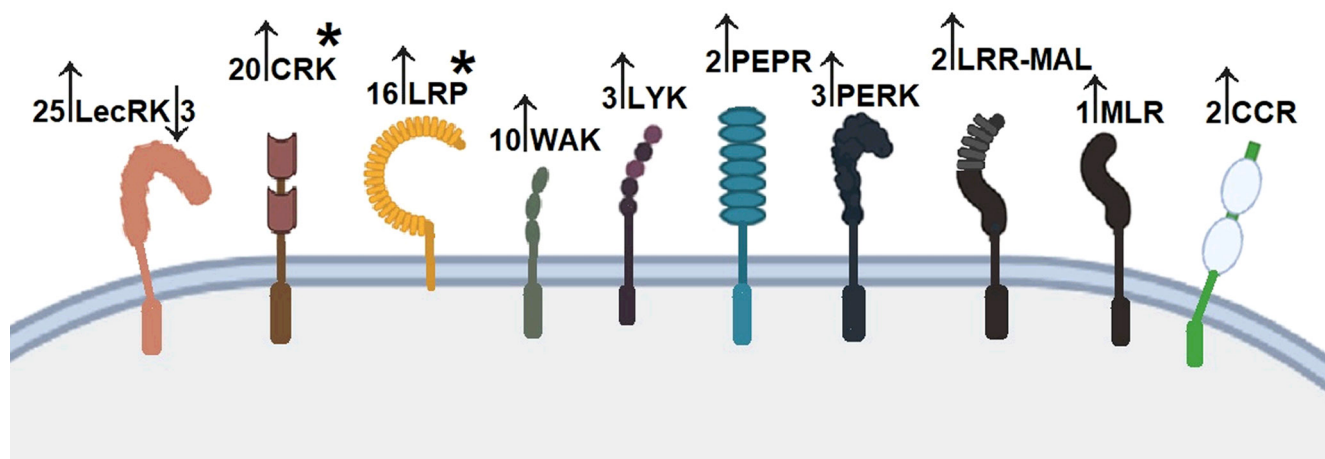


Рис. 1. Иммунные мембранные рецепторы PRR, экспрессия которых повышена у мутанта *par1 exa1*. Схематически показаны разные типы рецепторов и число кодирующих их генов, которые повышают (↑) или понижают (↓) свою экспрессию у мутанта *par1 exa1*. Группы генов, выявленные нами ранее [34], отмечены звездочкой (*). Список выявленных в данной работе рецепторов PRR и изменения уровня их экспрессии (log2FC) представлены в табл. 1 приложения.

У мутанта повышается также транскрипция генов неканонических каналов Ca^{2+} . Это гены, кодирующие рецепторы NLR-класса CC-NB-LRR, которые способны олигомеризоваться и образовывать Ca^{2+} -проводящие поры [57]. О повышенной экспрессии таких генов *ZAR1*, *ADR1* и *NRG1B* (*AT5G66910*) мы сообщали ранее [34]. Повышенный уровень ($\log_2\text{FC} = 6,04$, $\text{Padj} = 0,00084$) транскрипции гена *NRG1C* (*AT5G66890*) выявлен в данной работе. Результатом поступления Ca^{2+} в клетку является активация белковых молекул – сенсоров уровня кальция, среди которых гены *CLM* кальмодулина и *CML* кальмодулин-подобных белков (11 генов), гены кальциневрин В-подобных белков CBL и протеинкиназы, взаимодействующие с CBL (10 генов). Среди репрессированных генов нам удалось найти лишь один ген – *CIPK13* (рис. 2А).

Анализ генов, связанных с образованием АФК.
Среди активированных ДЭГ у мутанта найдены два гена *RBOHD* и *RBOHB* НАДФН-оксидаз, способных образовывать АФК. О продукции АФК в клетках мутанта свидетельствует также повышение транскрипции 18 генов пероксидаз, 20 генов глутатионпероксидаз, одного гена каталазы *CAT3* и трех генов гермин-подобных белков GLP, которые могут осуществлять функции супероксид-дисмутаз [58], и некоторых других (табл. 2 приложения). У мутанта повышена экспрессия редокс-чувствительного гена *OXII*, транскрипция которого регулируется H_2O_2 [16]. Ген *OXII* кодирует серин-треониновую протеинкиназу, которая активирует ряд MAP-киназ и опосредованно влияет на транскрипцию генов *RBOHD* и *RBOHB* НАДФН-оксидаз, гена *ICS1* синтеза СК, гена *PAD3* синтеза камалексина и гена *FMO1* синтеза

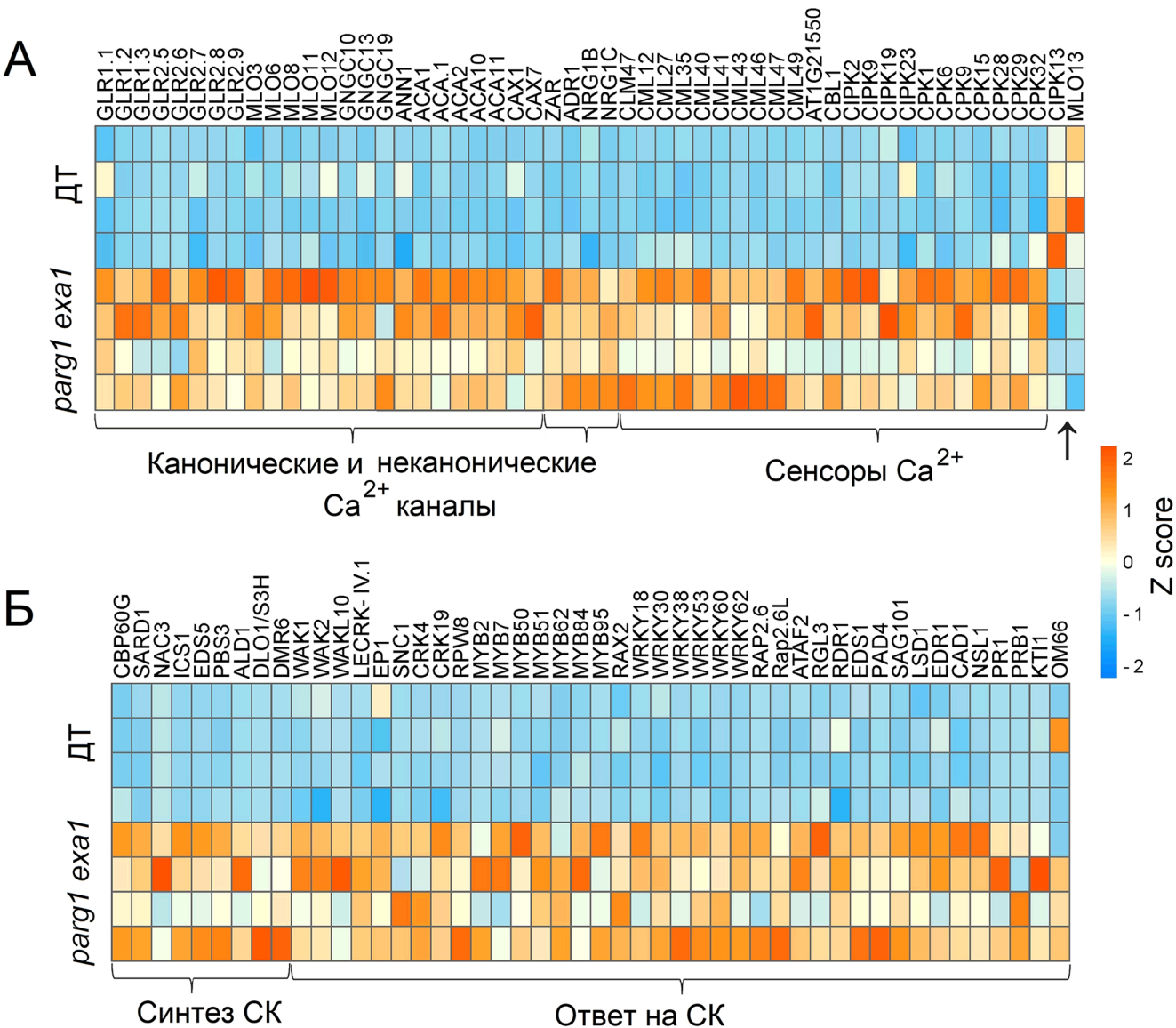


Рис. 2. ДЭГ, вовлеченные в сигнальный путь Ca^{2+} -сигналинга (А) и салициловой кислоты (Б). Различия в уровне экспрессии генов у ДТ и мутанта представлены в виде тепловой карты, построенной на основе расчета величин Z-score (по четыре повторности для каждого генотипа) с использованием ресурса SRplo. Справа на рис. А стрелкой отмечены два гена, снижающие экспрессию у мутанта.

пипекоевой кислоты [59]. Транскрипция всех перечисленных генов, играющих важнейшую роль в защите от патогенов, также повышена у мутанта.

Анализ генов, контролирующих сигнальные пути СК и EDS. Среди ДЭГ многие гены ассоциированы с ответом на СК. По результатам анализа с использованием ресурса AgriGO у мутанта повышена экспрессия 67 генов категории GO:0009751 (ответ на СК). Анализ транскриптома мутанта обнаружил повышение экспрессии ключевых генов, активирующих транскрипцию генов синтеза СК. Это Ca^{2+} -регулируемый ген *CBP60g* и ген *SARD1*, которые осуществляют совместную регуляцию генов синтеза СК [20]. У мутанта повышена также экспрессия гена ТФ NAC3, который активирует транскрипцию гена *ICS1* изохоризматсинтазы — ключевого фермента биосинтеза СК, катализирующего превращение хоризмата в изохоризмат в пластидах. У мутанта повышена транскрипция еще двух ключевых генов биосинтеза СК: гена *EDS5*, кодирующего транспортный белок MATE, необходимый для транспортировки изохоризмата в цитозоль, а также гена *PBS3*, превращающего изохоризмат в СК [60]. Повышена экспрессия гена *ALD1* аминотрансферазы, транскрипция которого активируется ТФ CBP60g и SARD1. Этот ген также важен для накопления в клетках высокого уровня СК [61].

Об активации сигнального пути СК у мутанта свидетельствует также повышение экспрессии многих генов ответа на СК. Среди них — гены PRR-рецепторов (WAK, WAKL, RLK-рецепторы) и рецепторов NLR (гены *SNC* и *RPW8*). Повышается экспрессия ряда генов ТФ семейств MYB, WRKY, AP2/ERF и NAC (рис. 2Б). Обнаружена активация гена *RGL3*, который кодирует негативный регулятор гиббереллинового пути с DELLA-доменом. Этот ген известен как мишень сигнального пути ЖК и как активатор этого пути [62]. Среди мишеней СК мы обнаружили еще одну известную мишень СК — активированный ген *RDR1* РНК-зависимой РНК-полимеразы, участвующей в посттранскрипционном замолкании генов [63].

Среди генов, регулируемых СК, есть все представители EDS1-семейства, которые работают как независимо от пути СК, так и вместе с ним. Это гены *EDS1*, *PAD4* и *SAG101* (рис. 2Б), которые поддерживают высокий уровень СК и активируют образование неканонических Ca^{2+} -пор, вторую волну «кальциевой вспышки» и смерть клеток. В то же время в списке генов, регулируемых СК, мы обнаружили негативный регулятор клеточной смерти — ген *LSD1* — с повышенной экспрессией (рис. 2Б). Выполняя молекулярную функцию транскрипционного регулятора и каркасного белка, LSD1 снижает содержание СК и подавляет клеточную смерть [64]. Среди мишеней СК в транскриптоме мутанта обнаружен еще один негативный регулятор ИО. Это ген *EDR1*, кодирующий Raf-подобную протеинкиназу MAPKKK, ко-

торая может взаимодействовать с белками EDS1, препятствуя формированию ими функциональных комплексов [65].

Интересно, что СК активировала также два гена гидролаз DLO/S3H и DMR6, которые могут превращать СК в 2,3-дигидроксibenзойную кислоту (рис. 2Б) [66, 67].

Среди генов, регулируемых СК, есть гены PR-белков: ген хитиназы *PR1* (главный маркер активации сигнального пути СК) и его гомолог *PRB1*, а также ген *KTII*, кодирующий ингибитор трипсина (рис. 2Б). Ранее мы сообщали и о повышении транскрипции ряда других PR-генов [34].

Анализ генов клеточной смерти (активированных СК и других). Мишенью сигнального пути СК является ген *OM66*, активирующий клеточную смерть. Ген *OM66* кодирует белок, образующий мультимерный комплекс на внешней мембране митохондрий и играющий важную роль в смерти клеток и амплификации сигналинга СК [68]. Протеазы — финальный компонент клеточной смерти. Ранее мы сообщали об активации трех генов метакспаз [34]. В данной работе обнаружена активация еще 5 генов цистеиновых протеаз, среди которых и гены протеаз *AT3G22260*, *AT4G01610*, которые активируются СК, и один ген, кодирующий фермент вакуолярного процессинга (табл. 2 приложения). О других генах — позитивных регуляторах клеточной смерти, повышающих экспрессию у мутанта, мы сообщали ранее [34].

Среди генов, активируемых СК, помимо позитивных регуляторов клеточной смерти мы нашли еще два негативных регулятора клеточной смерти. Это гены *CAD1*, *NSL1* — кодирующие белки, напоминающие перфорины животных и являющиеся частью их иммунной системы. Молекулярная функция этих белков у растений исследована не полностью. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что в клетках растений они подавляют ИО, зависимый от СК [69].

Обсуждение

Гены PARG1 и EXA1 — важные участники регуляции ИО. Анализ транскриптома мутанта резуховидки выявил активацию всех основных групп генов ИО. В данной работе мы дополнили список рецепторов ИО представителями 8 разных типов PRR-рецепторов (рис. 1; табл. 1 приложения). О еще двух типах PRR (CRK и RLP) мы сообщали ранее [34]. С учетом ранее выявленных, у мутанта в общей сложности повышена транскрипция 138 генов иммунных рецепторов, из которых 82 гена кодируют мембранные рецепторы PRR, а 56 генов — ядерно-цитоплазматические рецепторы NLR.

Выявлено повышение уровня транскрипции 17 генов, кодирующих канонические Ca^{2+} -проводящие каналы четырех типов (GLR-типе, MLO, CNGC, ANNAT1), которые повышают концен-

трацию Ca^{2+} в цитозоле в ответ на активацию рецепторов PRR. Повышается также уровень транскрипции 6 генов, которые кодируют каналы ACA и SAX, выводящие Ca^{2+} из клетки в вакуоли (рис. 1A) и способствующие предотвращению смерти клеток. Выявлен более высокий уровень транскрипции у мутанта генов неканонических Ca^{2+} -каналов, которые образуются после активации рецепторов NLR и обуславливают вторую волну поступления Ca^{2+} в клетки. Обнаруженные у мутанта 23 гена сенсоров Ca^{2+} (рис. 2A) с повышенным уровнем транскрипции могут активировать разнообразные белки, включая ТФ. Отметим, что у мутанта повышена экспрессия кальмодулин-связывающего ТФ СВР60g, который вместе с ТФ SARD1 позитивно регулирует гены синтеза СК и гены липазоподобных белков семейства EDS. Эти ТФ, как и регулируемые ими центральные сигнальные компоненты иммунного ответа, приводят к глобальному изменению спектра экспрессирующихся генов, необходимых для активации защитных систем.

Наряду с генами Ca^{2+} -сигналинга выявлено повышение транскрипции генов, которые связаны с образованием АФК (табл. 2 приложения). Активация Ca^{2+} -сигналинга и продукции АФК считаются самыми быстрыми ответами на атаку патогенов, которые необходимы для дальнейшей активации сенсоров кальция и белков, чувствительных к редокс-потенциалу. Результатом этих быстрых ответов являются так называемые «кальциевая вспышка» и «окислительный взрыв», способные вызвать гибель не только патогенов, но и самих растительных клеток, что ограничивает возможность распространения инфекции на соседние клетки.

Проявление большого числа активированных генов ИО является убедительным свидетельством проявления мощного аутоиммунитета у мутанта. В общей сложности среди ДЭГ в листьях мутанта *parg1 exa1* выявлено 2660 генов с увеличенным и 891 ген — со сниженным уровнем экспрессии по сравнению с ДТ [34]. В недавно опубликованной работе, проведенной на мутанте по гену *IBM1* (ген гистоновой H3K9-деметилазы) с аутоиммунным фенотипом [70], в растениях дифференциально экспрессируются по сравнению с ДТ 1396 активированных и 498 репрессированных генов, изменивших экспрессию более чем в два раза. Как и в нашем случае, основными группами активированных генов были гены защитного ответа. Других исследований аутоиммунных мутантов с использованием метода секвенирования РНК и детальным анализом транскриптома мы не обнаружили. Однако и этого сравнения достаточно, чтобы утверждать, что мутации *parg1 exa1* приводят к глобальному перепрограммированию генома, уровень которого сопоставим с таковым и даже превышает его при мутации в гене-эпигенетическом регулято-

ре. Полученные результаты указывают на новую и важную роль генов *PARG1* и *EXA1* в негативной регуляции ИО. Поскольку гены участвуют в контроле уровня поли(АДФ-рибозилирования) белков (*PARG1*) и деградации аномальных вариантов РНК (*EXA1*), можно предположить, что активация защитного ответа может быть результатом вызванного мутациями накопления высокого уровня поли(АДФ-рибозы) и аномальных мРНК, которые могут быть токсичными для клеток.

Особенности ИО, вызванного мутациями *parg1* и *exa1*. Проведенный ранее общий анализ транскриптомов мутанта и ДТ, а также изучение обогащения списков ДЭГ категориями Gene Ontology (GO), показал, что у мутанта среди активированных генов наблюдается перепредставленность категориями, связанными с ответом на самые разные стрессоры: бактерии, грибы, вирусы, насекомые, гипоксия, солевой стресс, окислительный стресс, недостаток влаги, жара и холод [34]. Отсутствие специфичности в проявлении защитного ответа подтверждается и обнаруженной в данной работе активацией у мутанта 10 типов рецепторов, которые связываются с разными лигандами.

На неспецифичность ответа указывает и одновременная активация у мутанта генов, контролирующих синтез и сигнальный путь двух главных стрессовых гормонов. Это путь СК, который анализировался в данной работе, и путь ЖК, анализ которого проведен ранее [34]. Одновременная активация конкурирующих сигнальных путей ЖК и СК указывает на особенность ИО, вызванного одновременным присутствием в гомозиготе мутаций *parg1* и *exa1*.

Еще одной особенностью ИО, связанной с мутациями *parg1* и *exa1*, является присутствие в транскриптоме мутанта активированных генов — негативных регуляторов ИО, действующих на разных этапах развития иммунного ответа. Это 7 генов Ca^{2+} -каналов, выкачивающих Ca^{2+} из цитозоля в вакуоли [56], и два гена кальмодулин-подобных белков CML46 и CML47, которые, в отличие от других белков CLM и CML, не активируют, а подавляют [71] уровень экспрессии центрального кальмодулин-связывающего ТФ СВР60g, активирующего транскрипцию генов синтеза СК и генов семейства EDS1 [20]. Негативные регуляторы клеточной смерти — гены *CAD1*, *NSL1*, *LSD1* — подавляют ИО, зависимый от СК [69, 64]. Ген *EDR1* препятствует нормальной сборке комплекса белков семейства EDS1 [65], а гены гидролаз DLO/S3H и DMR6 снижают уровень СК, превращая ее в 2,3-дигидроксibenзойную кислоту [66, 67]. Таким образом, одновременно с активацией генов, усиливающих ИО (гены рецепторов ИО, гены сигнальных путей Ca^{2+} , АФК, СК, ЖК, гены EDS и клеточной смерти), активируется транскрипция генов, способных снизить уровень ИО. Можно предполагать, что уникаль-

ная особенность фенотипа мутанта *parg1 exa1* — его способность к регенерации — обусловлена работой негативных регуляторов ИО.

Изучение аутоиммунного двойного мутанта *parg1 exa1* проведено впервые, хотя ранее проводили исследования одиночных мутантов резуховидки *parg1* или *exa1*. Было показано, что только после воздействия генотоксикантов или патогенов (или их эффекторов) одиночные мутанты проявляют выраженную клеточную смерть в листьях [40, 39]. Видимого усиления ИО в отсутствие стрессоров у одиночных мутантов *parg1* не наблюдалось [37, 39]. Изучение транскриптома листьев мутанта *parg1* и растений ДТ с помощью микрочипов выявило только 128 ДЭГ, среди которых было 10 генов рецепторов NLR с повышенной экспрессией [72]. Транскриптом мутантов *exa1* не исследовался. В то же время, в растениях мутантов *exa1* обнаружен повышенный уровень экспрессии генов *PR1* [40], *PR1*, *PR2* [41] и *PR5* [73], указывающих на проявление аутоиммунитета. Кроме того, обнаружено накопление белка (но не мРНК) четырех генов рецепторов NLR, что позволило предположить, что белок EXA1, взаимодействуя с фактором инициации трансляции eIF4E, может блокировать трансляцию NLR мРНК, предотвращая аутоиммунитет [41].

Мутации *parg1* и *exa1*, обнаруженные у мутанта *tae*, получены на кафедре генетики МГУ, и они отличаются по характеру генетических нарушений от ранее исследованных [34]. Тем не менее, растения, гомозиготные по одной из мутаций *parg1* или *exa1*, не отличаются от ДТ. Фенотипические изменения (суженный лист, клеточная смерть по краю листа, возврат клеток к плюрипотентному состоянию и образование эктопических выростов) обнаруживаются только у двойного мутанта, что указывает на синергистическое взаимодействие генов

PARG1 и *EXA1* в контроле ИО у растений ДТ. На каком уровне может осуществляться взаимодействие генов *PARG1* и *EXA1*, пока не известно.

Заключение

Проведенный в данной работе анализ транскриптома показал, что растения двойного мутанта резуховидки *parg1 exa1* проявляют мощный аутоиммунитет. Это выражается в активации транскрипции всех основных групп генов, участвующих в развитии иммунитета растений, включая гены мембранных и ядерно-цитоплазматических иммунных рецепторов, Ca^{2+} -проводящих каналов и Ca^{2+} -сигналинга, гены, связанные с образованием АФК, сигнальными путями стрессовых гормонов, клеточной смертью и пр.

В отличие от других аутоиммунных мутантов, у исследованного в данной работе мутанта отсутствует специфичность в проявлении защитного ответа, о чем свидетельствует повышение транскрипции 10 типов рецепторов, которые распознают разные лиганды, а также одновременная активация конкурирующих сигнальных путей ЖК и СК.

Таким образом, впервые установлено, что ген *PARG1* (способствует выживанию клеток в условиях генотоксического стресса, снижая уровень поли(АДФ-рибозы)) и ген *EXA1* (участвует в нонсенс-опосредованном распаде мРНК) играют важную роль регуляторов иммунного ответа. Они ограничивают уровень ИО, независимо от причины, вызвавшей активацию иммунитета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-04-00149_а). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Böhm H., Albert I., Fan L., Reinhard A., Nürnberger T. Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2014;20:47–54.
2. de Azevedo E., Manhães A.M., Ortiz-Moreno F.A., He P., Shan L. Plant plasma membrane-resident receptors: Surveillance for infections and coordination for growth and development. *J. Integr. Plant Biol.* 2021;63(1):79–101.
3. Maruta N., Burdett H., Lim B.Y.J., Hu X., Desa S., Manik M.K., Kobe B. Structural basis of NLR activation and innate immune signalling in plants. *Immunogenetics.* 2022;74(1):5–26.
4. Lüdke D., Yan Q., Rohmann P.F., Wiermer M. NLR we there yet? Nucleocytoplasmic coordination of NLR-mediated immunity. *New Phytol.* 2022;236(1):24–42.
5. Zhang B., Liu M., Wang Y., Yuan W., Zhang H. Plant NLRs: Evolving with pathogen effectors and engineerable to improve resistance. *Front. Microbiol.* 2022;13:1018504.
6. Marcec M.J., Gilroy S., Poovaiah B.W., Tanaka K. Mutual interplay of Ca^{2+} and ROS signaling in plant immune response. *Plant Sci.* 2019;283:343–354.
7. Xu G., Moeder W., Yoshioka K., Shan L. A tale of many families: calcium channels in plant immunity. *Plant Cell.* 2022;34(5):1551–1567.
8. Köster P., DeFalco T.A., Zipfel C. Ca^{2+} signals in plant immunity. *EMBO J.* 2022;41(12):e110741.
9. Bi G., Su M., Li N., Liang Y., Dang S., Xu J., Hu M., Wang J., Zou M., Deng Y., Li Q., Huang S., Li J., Chai J., He K., Chen Y.H., Zhou J.M. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell.* 2021;184(13):3528–3541.
10. Jacob P., Kim N.H., Wu F., El-Kasbi F., Chi Y., Walton W.G., Furzer O.J., Lietzan A.D., Sunil S., Kempthorn K., Redinbo M.R., Pei Z.M., Wan L., Dangl J.L. Plant “helper” immune receptors are Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels. *Science.* 2021;373(6553):420–425.

11. Allan C., Morris R.J., Meisrimler C.N. Encoding, transmission, decoding, and specificity of calcium signals in plants. *J. Exp. Bot.* 2022;73(11):3372–3385.
12. Galon Y., Finkler A., Fromm H. Calcium-regulated transcription in plants. *Mol. Plant.* 2010;3(4):653–669.
13. Ren H., Zhang Y., Zhong M., Hussian J., Tang Y., Liu S., Qi G. Calcium signaling-mediated transcriptional reprogramming during abiotic stress response in plants. *Theor. Appl. Genet.* 2023;136(10):210.
14. Kimura S., Hunter K., Vaahtera L., Tran H.C., Citterico M., Vaattovaara A., Rokka A., Stolze S.C., Harzen A., Meißner L., Wilkens M.M.T., Hamann T., Toyota M., Nakagami H., Wrzaczek M. CRK2 and C-terminal phosphorylation of NADPH oxidase RBOHD regulate reactive oxygen species production in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2020;32(4):1063–1080.
15. Bourdais G., Burdiak P., Gauthier A., Nitsch L., Salojärvi J., Rayapuram C., Idänheimo N., Hunter K., Kimura S., Merilo E., Vaattovaara A., Oracz K., Kaufholdt D., Pallon A., Anggoro D.T. et al. Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning Roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genet.* 2015;11(7):e1005373.
16. Rentel M.C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S.L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S.C., Grierson C.S., Hirt H., Knight M.R. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature.* 2004;427(6977):858–861.
17. Dietz K.J. Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014;21(9):1356–1372.
18. He H., Breusegem F., Mhamdi A. Redox-dependent control of nuclear transcription in plants. *J. Exp. Bot.* 2018;69(14):3359–3372.
19. Мацкевич В.С., Самохина В.В., Гриусевич П.В., Войтехович М.А., Соколик А.И., Демидчик В.В. Ca²⁺-проницаемые катионные каналы плазматической мембраны клеток высших растений. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2018;2:11–26.
20. Sun T., Zhang Y., Li Y., Zhang Q., Ding Y., Zhang Y. ChIP-seq reveals broad roles of SARD1 and CBP60g in regulating plant immunity. *Nat. Commun.* 2015;6(1):1.
21. Cui H., Gobbato E., Kracher B., Qiu J., Bautor J., Parker J.E. A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in *Arabidopsis* immunity. *New Phytol.* 2017;213(4):1802–1817.
22. Reikhter D., Lüdke D., Ding Y., Feussner K., Zienkiewicz K., Lipka V., Wiermer M., Zhang Y., Feussner I. Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science.* 2019;365(6452):498–502.
23. Wang Z., Liu X., Yu J., Yin S., Cai W., Kim N.H., El Kasmí F., Dangel J.L., Wan L. Plasma membrane association and resistosome formation of plant helper immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2023;120(32):e2222036120.
24. Saleem M., Fariduddin Q., Castroverde C.D.M. Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiol. Biochem.* 2021;168:381–397.
25. Zhang N., Zhou S., Yang D., Fan Z. Revealing shared and distinct genes responding to JA and SA signaling in *Arabidopsis* by meta-analysis. *Front. Plant Sci.* 2020;11:908.
26. Zhou J.M., Zhang Y. Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell.* 2020;181(5):978–989.
27. Balakireva A.V., Zamyatnin A.A. Cutting out the gaps between proteases and programmed cell death. *Front. Plant Sci.* 2019;10:704.
28. Kovács J., Poór P., Szepesi Á., Tari I. Salicylic acid induced cysteine protease activity during programmed cell death in tomato plants. *Acta Biol. Hung.* 2016;67(2):148–158.
29. Robert-Seilanianantz A., Grant M., Jones J.D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011;49:317–343.
30. Zhang Y., Li X. Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019;50:29–36.
31. Yang J., Duan G., Li C., Liu L., Han G., Zhang Y., Wang, C. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1349.
32. Chakraborty J., Ghosh P., Das S. Autoimmunity in plants. *Planta.* 2018;248(4):751–767.
33. Freh M., Gao J., Petersen M., Panstruga R. Plant autoimmunity-fresh insights into an old phenomenon. *Plant Physiol.* 2022;188(3):1419–1434.
34. Kupriyanova E., Manakhov A., Ezhova T. *PARG1* and *EXA1* genes as possible components of the facultative epigenetic control of plant development. *Physiol. Plant.* 2023;175(4):e13959.
35. Kupriyanova E.V., Denisova E.R., Baier M.A., Ezhova T.A. Differences in the manifestation of cell pluripotency *in vivo* and *in vitro* in the mutant *Arabidopsis thaliana* with the phenotype of cell memory disorder. *Russ. J. Plant Physiol.* 2021;68(1):46–55.
36. Adams-Phillips L., Briggs A.G., Bent A.F. Disruption of poly(ADP-ribosylation) mechanisms alters responses of *Arabidopsis* to biotic stress. *Plant Physiol.* 2010;152(1):267–280.
37. Feng B., Liu C., de Oliveira M.V., Intorne A.C., Li B., Babilonia K., de Souza Filho G.A., Shan L., He P. Protein poly(ADP-ribosylation) regulates *Arabidopsis* immune gene expression and defense responses. *PLoS Genet.* 2015;11:e1004936.
38. Li G., Nasar V., Yang Y., Li W., Liu B., Sun L., Li D., Song F. *Arabidopsis* poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1 is required for drought, osmotic and oxidative stress responses. *Plant Sci.* 2011;180(2):283–291.
39. Zhang H., Gu Z., Wu Q., Yang L., Liu C., Ma H., Xia Y., Ge X. *Arabidopsis* PARG1 is the key factor promoting cell survival among the enzymes regulating post-translational poly(ADP-ribosylation). *Sci. Rep.* 2015;5:15892.
40. Matsui H., Nomura Y., Egusa M., Hamada T., Hyon G.S., Kaminaka H., Watanabe Y., Ueda T., Trujillo M., Shirasu K., Nakagami H. The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. *PLoS Genet.* 2017;13:e1007037.
41. Wu Z., Huang S., Zhang X., Wu D., Xia S., Li X. Regulation of plant immune receptor accumulation through translational repression by a glycine-tyrosine-phenylalanine (GYF) domain protein. *eLife.* 2017;6:e23684.
42. Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., Xu W., Su Z. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W122–W129.
43. Sun Y., Qiao Z., Muchero W., Chen J.G. Lectin receptor-like kinases: the sensor and mediator at the plant cell surface. *Front. Plant Sci.* 2020;11:596301.
44. Liu L., Liu J., Xu N. Ligand recognition and signal transduction by lectin receptor-like kinases in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 2023;14:1201805.

45. Verica J.A., He Z.H. The cell wall-associated kinase (*WAK*) and *WAK*-like kinase gene family. *Plant Physiol.* 2002;129(2):455–459.
46. Zhang Z., Huo W., Wang X., Ren Z., Zhao J., Liu Y., He K., Zhang F., Li W., Jin S., Yang D. Origin, evolution, and diversification of the wall-associated kinase gene family in plants. *Plant Cell Rep.* 2023;42(12):1891–1906.
47. Yamaguchi Y., Huffaker A., Bryan A.C., Tax F.E., Ryan C.A. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2010;22(2):508–522.
48. Invernizzi M., Hanemian M., Keller J., Libourel C., Roby D. PERKing up our understanding of the proline-rich extensin-like receptor kinases, a forgotten plant receptor kinase family. *New Phytol.* 2022;235(3):875–884.
49. Martín-Dacal M., Fernández-Calvo P., Jiménez-Sandoval P., López G., Garrido-Arandia M., Rebaque D., Del Hierro I., Berlanga D.J., Torres M.Á., Kumar V., Mérida H., Pacios L.F., Santiago J., Molina A. *Arabidopsis* immune responses triggered by cellulose- and mixed-linked glucan-derived oligosaccharides require a group of leucine-rich repeat lectin receptor kinases. *Plant J.* 2023;113(4):833–850.
50. Wan J., Tanaka K., Zhang X.C., Son G.H., Brechenmacher L., Nguyen T.H., Stacey G. LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2012;160(1):396–406.
51. Stokes K.D., Gururaj Rao A. Dimerization properties of the transmembrane domains of *Arabidopsis* CRINKLY4 receptor-like kinase and homologs. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;477(2):219–226.
52. Ortiz-Moreno F.A., Liu J., Shan L., He P. Lectin-like receptor kinases as protector deities in plant immunity. *Nat. Plants.* 2022;8(1):27–37.
53. Hernandez-Coronado M., Araujo P.C.D., Ip P.L., Nunes C.O., Rahni R., Wudick M.M., Lizzio M.A., Feijo J.A., Birnbaum K.D. Plant glutamate receptors mediate a bet-hedging strategy between regeneration and defense. *Dev. Cell.* 2022;57(4):451–465.
54. Acevedo-Garcia J., Kusch S., Panstruga R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytol.* 2014;204(2):273–281.
55. Wu X., Wang Y., Bian Y., Ren Y., Xu X., Zhou F., Ding H. A critical review on plant annexin: Structure, function, and mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* 2022;190:81–89.
56. Wang C., Luan S. Calcium homeostasis and signaling in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2024;77:102485.
57. Saile S.C., El Kasmi F. Small family, big impact: RNL helper NLRs and their importance in plant innate immunity. *PLoS Pathog.* 2023;19(4):e1011315.
58. Membré N., Bernier F., Staiger D., Berna A. *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta.* 2000;211(3):345–354.
59. Rawat A.A., Hartmann M., Harzen A., Lukan R., Stolze S.C., Forzani C., Abts L., Reißweber S., Rayapuram N., Nakagami H., Zeier J., Hirt H. OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1 induces immunity by coordinating N-hydroxy-pipecolic acid, salicylic acid, and camalexin synthesis. *New Phytol.* 2023;237(4):1285–1301.
60. Lefevre H., Bauters L., Gheysen G. Salicylic acid biosynthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 2020;11: 338.
61. Yoo S.J., Choi H.J., Noh S.W., Cecchini N.M., Greenberg J.T., Jung H.W. Genetic requirements for infection-specific responses in conferring disease resistance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 2022;13:1068438.
62. Wild M., Achard P. The DELLA protein RGL3 positively contributes to jasmonate/ethylene defense responses. *Plant Signal. Behav.* 2013;8(4):e23891.
63. Hunter L.J., Westwood J.H., Heath G., Macaulay K., Smith A.G., Macfarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P. Regulation of RNA-dependent RNA polymerase 1 and isochorismate synthase gene expression in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 2013;8(6):e66530.
64. Bernacki M.J., Rusaczek A., Czarnocka W., Karpiński S. Salicylic acid accumulation controlled by LSD1 is essential in triggering cell death in response to abiotic stress. *Cells.* 2021;10(4):962.
65. Neubauer M., Serrano I., Rodibaugh N., Bhandari D.D., Bautor J., Parker J.E., Innes R.W. *Arabidopsis* EDR1 protein kinase regulates the association of EDS1 and PAD4 to inhibit cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2020;33(4):693–703.
66. Zhang K., Halitschke R., Yin C., Liu C.J., Gan S.S. Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(36):14807–14812.
67. Zhang Y.J., Zhao L., Zhao J.Z., Li Y.J., Wang J.B., Guo R., Gan S.S., Liu C.J., Zhanga K.W. S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiol.* 2017;175(3):1082–1093.
68. Zhang B., Van Aken O., Thatcher L., De Clercq I., Duncan O., Law S.R., Murcha M.W., van der Merwe M., Seifi H.S., Carrie C., Cazzonelli C., Radomiljac J., Höfte M., Singh K.B., Van Breusegem F., Whelan J. The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2014;80(4):709–727.
69. Holmes D.R., Bredow M., Thor K., Pascetta S.A., Sementchoukova I., Siegel K.R., Zipfel C., Monaghan J. A novel allele of the *Arabidopsis thaliana* MACPF protein CAD1 results in deregulated immune signaling. *Genetics.* 2021;217:iyab022.
70. Lv S., Yang Y., Yu G., Peng L., Zheng S., Singh S.K., Vilchez J.I., Kaushal R., Zi H., Yi D., Wang Y., Luo S., Wu X., Zuo Z., Huang W., Liu R., Du J., Macho A.P., Tang K., Zhang H. Dysfunction of histone demethylase IBM1 in *Arabidopsis* causes autoimmunity and reshapes the root microbiome. *ISME J.* 2022;16(11):2513–2524.
71. Lu Y., Truman W., Liu X., Bethke G., Zhou M., Myers C.L., Katagiri F., Glazebrook J. Different modes of negative regulation of plant immunity by calmodulin-related genes. *Plant Physiol.* 2018;176(4):3046–3061.
72. Briggs A.G., Adams-Phillips L.C., Keppler B.D., Zebell S.G., Arend K.C., Apfelbaum A.A., Smith J.A., Bent A.F. A transcriptomics approach uncovers novel roles for poly(ADP-ribosylation) in the basal defense response in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2017;12:e0190268.
73. Hashimoto M., Neriya Y., Keima T., Iwabuchi N., Koinuma H., Hagiwara-Komoda Y., Ishikawa K., Himeno M., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2016;88(1):120–131.

Поступила в редакцию 10.04.2024

После доработки 01.10.2024

Принята в печать 12.12.2024

RESEARCH ARTICLE

PARG1 and *EXA1* interacting genes are important regulators of autoimmunity in plants

E.V. Kupriyanova^{1,*} , K.A. Manakhova², T.A. Ezhova¹ 

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

²Center of Genetics and Life Science, Sirius University of Science and Technology, Sirius, Sochi, Krasnodar region, 354340, Russia

*e-mail: ekupriyanova@gmail.com

Studies were performed on the *Arabidopsis* double mutant plants *parg1 exa1* characterized by cell death along the leaf margin, activation of expression of immune receptor genes, PR-genes and hypersensitive response genes, which is a sign of autoimmunity. At the same time, unlike other autoimmunity mutations, the *parg1 exa1* mutant demonstrated the acquisition of pluripotency by leaf cells and the ability to regenerate new leaf margins. Because of the unusual phenotype, this study analyzed in depth the transcriptome of young leaves of mutant and wild-type plants. The mutant was found to have increased expression levels of all major components of the immune response, including genes for Ca²⁺ conducting channels, NADPH oxidases, salicylic acid synthesis genes, jasmonic acid, and many others. The findings suggest that *PARG1* and *EXA1* genes, which control the level of poly(ADP-ribosylation) and the process of nonsense-mediated RNA degradation, respectively, are important regulators of the immune response. Their function is essential to prevent overactivation of defense systems in plants.

Keywords: Plant autoimmunity, transcriptome, immune receptors, salicylic acid, cell death, mutations

Funding: The research was funded by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-04-00149_a).

Сведения об авторах

Куприянова Евгения Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-90; e-mail: ekupriyanova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8106-5911>

Ежова Татьяна Анатольевна — докт. биол. наук, проф. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-90; e-mail: ezhova2001@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5816-3051>

Манахова Карина Айратовна — науч. сотр. (направление «Генетика») научного центра генетики и наук о жизни Научно-технологического университета Сириус. Тел.: 8-800-100-41-55; manakhova.ka@talantiuspeh.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7405-1914>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 575.174+575.113

Изучение структурных особенностей нетранскрибируемых спейсеров 5S-рДНК *Citrus sinensis* и *C. reticulata*

О.С. Александров* , Д.В. Романов

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42
*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Апельсин (*Citrus sinensis*) и мандарин (*C. reticulata*) являются экономически важными сельскохозяйственными растениями, которые выращиваются во многих странах мира, в том числе и на юге России. В связи с этим широко проводятся их генетические исследования, включающие как секвенирование отдельных локусов, так и полногеномное секвенирование. Одними из важнейших локусов генома являются массивы генов 5S рибосомной РНК, которые представляют собой tandemные повторы. Их мономеры состоят из консервативной кодирующей 120-нуклеотидной части и нетранскрибируемого спейсера (NTS), который часто имеет различную длину и последовательность у разных видов. В данной работе были секвенированы и изучены 8 NTS апельсина (сорт Гамлин) и 16 NTS мандарина (мандарин иволистный – 3, сорт Карликовый Уншиу – 8, Тиахара – 4 и Уншиу – 1). Полученные NTS имели различную длину и были разделены на два класса – NTS_218 (длиной 217–221 п.о.) и NTS_381 (длиной 381 п.о.). Была изучена внутренняя структура NTS обоих классов и распределение характерных для NTS ДНК-мотивов. Полученные результаты расширяют теоретическое понимание природы NTS и знание о строении NTS у близкородственных видов. Они могут быть использованы при анализе гибридов и сортов цитрусовых, выведенных с участием апельсина и мандарина.

Ключевые слова: апельсин, мандарин, NTS, поли-T-мотивы, поли-G-мотивы, ДНК повторы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-3

Введение

Подтриба Citrinae Engl. относится к семейству Рутовые (Rutaceae Juss.) и входит в трибу Aurantieae подсемейства Померанцевые (Aurantioideae Eaton.) [1]. Одним из самых известных родов этой подтрибы является род *Citrus* L., виды которого (прежде всего, апельсин (*C. sinensis* (L.) Osbeck), грейпфрут (*C. paradisi* Macfad.), лимон (*C. limon* (L.) Osbeck), мандарин (*C. reticulata* Blanco) и некоторые другие) – это широко распространенные садовые плодовые деревья [2]. Согласно современным генетическим исследованиям, цитрусовые появились около 8 млн лет назад в регионе, включающем северо-восточную Индию, Мьянму и юго-восточный Китай. Выделяют четыре предковых вида – помело (*C. maxima* (Burm.) Merr.), цитрон (*C. medica* L.), лайм (*C. aurantiifolia* Christm.) и мандарин. В процессе одомашнивания, спонтанных и направленных скрещиваний получались известные на сегодняшний день формы. Так, скрещивание мандарина и помело привело к появлению апельсина и некоторых подвидов мандарина, а гибридизация апельсина с помело привела к появлению грейпфрута [1].

Апельсин и мандарин возделываются как сельскохозяйственные растения во многих странах мира и имеют для некоторых из них важное экономическое значение, поскольку торговля плодами этих видов составляет значительную долю в структуре их экспорта [3–6]. В связи с этим ведутся селекционная работа и широкое генетическое изучение данных и родственных им видов цитрусовых. На данный момент получен огромный массив генетических и геномных данных представителей подтрибы Citrinae, состоящий из результатов секвенирования отдельных локусов и целых геномов [7–11].

Среди часто изучаемых локусов генома важное теоретическое и прикладное значение имеют гены, кодирующие 5S рибосомную РНК (5S-рРНК), которая у эукариот входит в состав большой 60S субъединицы рибосом [12]. У большинства эукариот, в том числе и у высших семенных растений, эти гены не входят в кластер с генами 18S, 5.8S и 26S рРНК, но присутствуют в геноме в виде отдельных от них массивов, которые представляет собой, по сути, tandemные ДНК-повторы [13–15]. Мономер 5S рибосомной ДНК (5S-рДНК) состоит из двух

частей: консервативного 120-нуклеотидного участка, транскрибируемого РНК-полимеразой III, и не-транскрибируемого спейсера (NTS) [16, 17]. Длина и нуклеотидная последовательность NTS часто являются геном- или субгеномспецифичными и могут иметь различия даже у близкородственных видов. В связи с этим полиморфизм 5S-рДНК широко используется в исследованиях, связанных с установлением филогенетических отношений между видами, анализе гибридов, а также при разработке видо- и субгеномспецифичных ДНК-маркеров [18–27]. Несмотря на вариабельность, NTS многих организмов имеют некоторые общие структурные элементы. Прежде всего, это содержащиеся в начале NTS Т-богатые мотивы и ТАТА-подобные мотивы в положении около –25––30 п.о. с конца NTS. Также NTS ряда видов может содержать внутри поли-Т- или микросателлитные блоки [17, 28–35].

Благодаря тому, что 120-нуклеотидная транскрибируемая часть мономера 5S-рДНК является консервативной, подобранная на ее основе пара праймеров позволяет проводить амплификацию NTS у широкого спектра видов. Использование таких универсальных праймеров неоднократно встречается в ранее опубликованных работах [36–39], и можно сказать, что они показали себя в качестве эффективных инструментов для изучения 5S-рДНК даже в малоизученных, не полностью секвенированных, геномах [28].

В данной работе впервые были секвенированы и изучены NTS апельсина и мандарина (24 последовательности). Полученные результаты и выводы имеют теоретическое значение (расширяют понимание о структуре NTS, знание о строении NTS у близкородственных видов и т.д.) и могут быть использованы в практической селекционной работе при анализе гибридов и сортов цитрусовых, выведенных с участием апельсина и мандарина.

Материалы и методы

Растительный материал и выделение ДНК.

В работе использовались пять растений апельсина (сорта Вашингтон Навел (питомник «Павловский лимон»), Гамлин (Лаборатория плодводства РГАУ-МСХА им. Тимирязева), Голден Бакай (питомник «Садовод Крым»), Навелина (питомник «Павловский лимон»), Томсон Навелин (питомник «Садовод Крым»)) и семь растений мандарина (мандарин иволлистный (питомник «Павловский лимон»), Карликовый Уншиу (питомник «Садовод Крым»), Кавано-Васе (питомник «Павловский лимон»), Михо-Васе (питомник «Садовод Крым»), Сацума (питомник «Павловский лимон»), Тиэхара (питомник «Павловский лимон») и Уншиу (Лаборатория плодводства РГАУ-МСХА им. Тимирязева)). С данных растений, выращиваемых в оранжерее ФГБНУ ВНИИСБ, были собраны молодые листья и выделена ДНК по методике Дойл и Дойл (1990) с модификациями [40, 41].

Амплификация, клонирование и секвенирование.

Для амплификации NTS изучаемых растений проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами 5S1/5S2 [39] на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих условиях: 1) 94°C – 5 мин; 2) 30 циклов (94°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 20 с); 3) 72°C – 10 мин. Ампликоны разделяли в 2,5%-ном агарозном геле при 5 В/см и детектировали с помощью системы гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Ампликоны клонировали в вектор pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Для химической трансформации использовали компетентные клетки XL1-Blue (ЗАО «Евроген», Россия) согласно инструкции их применения. Отбор целевых колоний проводили с помощью бело-голубой селекции. Анализ вставок проводили методом ПЦР с праймерами M-13 (forward 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'; reverse 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') при следующих условиях: 1) 94°C – 5 мин; 2) 30 циклов (94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин 30 с); 3) 72°C – 10 мин. Секвенирование вставок проводилось на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems (США).

Обработка последовательностей и их анализ.

Конвертация секвенированных последовательностей в FASTA формат производилась с помощью программы «ab1 viewer» (https://www.chiplot.online/static/ChiBioTools/src/ab1_file.html). Последовательности NTS выделялись из вставок при выравнивании с последовательностью гена 5S-рРНК льна (X01531). Обработка последовательностей, выравнивания, поиск ДНК-мотивов и расчет уровня идентичности осуществлялись с помощью программы «GenDoc» [42].

Поиск микросателлитных мотивов осуществлялся с помощью программы «DNA Microsatellites Finder» (<https://www.novoprolabs.com/tools/microsatellites-finder>).

Результаты и обсуждение

Результаты (особенности) амплификации NTS апельсина и мандарина.

ДНК пяти растений апельсина (сорта Вашингтон Навел, Гамлин, Голден Бакай, Навелина и Томсон Навелин) и семи растений мандарина (Мандарин иволлистный, сорта мандарина Карликовый Уншиу, Кавано-Васе, Михо-Васе, Сацума, Тиэхара и Уншиу) была использована в качестве матрицы в ПЦР-эксперименте с праймерами 5S1/5S2. Электрофоретическое разделение ампликонов показало во всех паттернах наличие мажорных фрагментов длиной 316–320 п.о. (рис. 1), включающих в себя NTS длиной 218–220 п.о. (система праймеров подобрана так, что вместе с NTS амплифицируются участки гена 5S-рРНК длиной 98 п.о.). В нескольких профилях также присутствовал минорный компонент длиной около 700–800 п.о., оче-

видно, включающий в себя несколько мономеров «ген 5S-рРНК + NTS», что часто наблюдается при амплификации тандемных повторов [26]. Профили апельсина сорта Гамлин и мандарина сортов Карликовый Уншиу и Тиахара включали дополнительные фрагменты длиной порядка 480 п.о., что соответствует длине содержащихся в них NTS около 380 п.о. Кроме того, профиль мандарина сорта Тиахара содержал фрагменты около 150 п.о. с NTS длиной около 50 п.о.

В целом, приблизительные длины NTS апельсина и мандарина, полученные при проведении ПЦР-экспериментов с помощью праймеров 5S1/5S2, находятся в диапазоне 100–700 п.о., как и NTS многих других организмов [17]. Короткие же NTS, сходные по длине с дополнительными NTS-фрагментами мандарина сорта Тиахара, встречаются нечасто и были описаны для тополя белого и некоторых видов диких злаков [43–45].

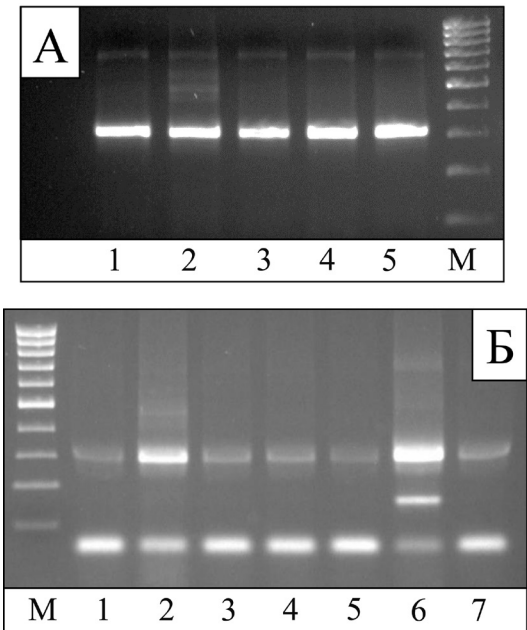


Рис. 1. Результаты амплификации NTS апельсина и мандарина с помощью праймеров 5S1/5S2 [39]: **А** – ампликоны апельсина сортов Вашингтон Навел (1), Гамлин (2), Голден Бакай (3), Навелина (4), Томсон Навелин (5), **Б** – ампликоны мандарина иволлистного (1) и сортов Карликовый Уншиу (2), Кавано-Васе (3), Михо-Васе (4), Сацума (5), Тиахара (6) и Уншиу (7). М – маркер молекулярного веса с шагом 100 п.о.

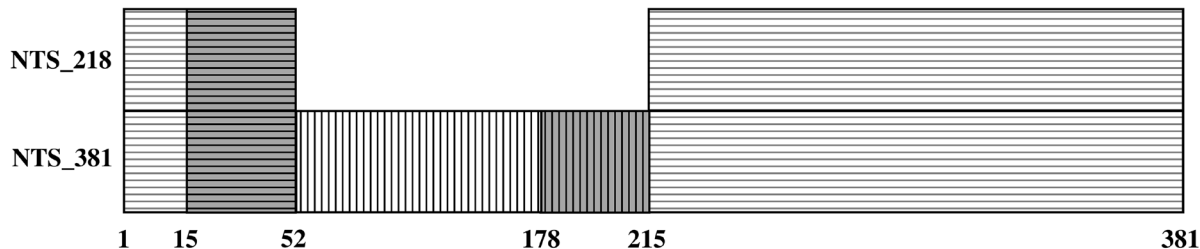


Рис. 2. Сравнительная схема последовательностей классов NTS_218 и NTS_381. Горизонтальной штриховкой обозначены участки с высоким уровнем идентичности. Вертикальной штриховкой обозначена инсерция в NTS_381. Серым цветом обозначены идентичные 38-нуклеотидные участки перед инсерцией и на ее конце. Границы участков обозначены порядковыми номерами соответствующих нуклеотидов под схемой.

Клонирование, секвенирование и особенности NTS апельсина и мандарина. Ампликоны апельсина сорта Гамлин, мандарина иволлистного и мандарина сортов Карликовый Уншиу, Тиахара и Уншиу были очищены и клонированы в АТ-векторе. Было получено 24 клона, содержащих целевые вставки (апельсин сорта Гамлин – 8, мандарин иволлистный – 3, мандарин сортов Карликовый Уншиу – 8, Тиахара – 4 и Уншиу – 1). ПЦР-продукты вставок, полученные при амплификации с праймерами M13, были секвенированы. Все вставки содержали последовательности NTS, которые были проанализированы и размещены в базе данных GenBank (PQ141631–PQ141654).

Среди последовательностей NTS апельсина сорта Гамлин шесть имели длину 217–218 п.о. (L13, L16, L17, L18, L21, L23), одна – 250 п.о. (L19) и одна – 381 п.о. (L14). Анализ последовательности L14 (381 п.о.) показал высокий уровень идентичности с последовательностями 217–218 п.о. (90–98%) на участках с 1 по 52 п.о. и с 216 по 381 п.о. BLAST-анализ инсерции L14 53_215 показал наличие на ее конце 38-нуклеотидного участка, который был практически полностью идентичен участку L14 15_52 (имелась G/A замена в положении 30 п.о.), который граничит с данной инсерцией вверх по цепи (рис. 2). Ввиду существенных отличий по длине и структуре NTS длиной 217–218 п.о. и 381 п.о. были отнесены к двум классам: NTS_218 и NTS_381. Наличие двух классов NTS в одном геноме (или субгеноме) ранее было описано и у других растений – например, у элимусов, псевдорогнерий и ячменей [45–47]. Данный факт может быть косвенным свидетельством гибридного происхождения таких видов.

Анализ последовательности L19 (250 п.о.) показал наличие 31-нуклеотидной дупликации в начале этого NTS. Выравнивание участка L19 32_250 данного NTS показало высокий уровень идентичности (88–95%) с остальными NTS_218 апельсина сорта Гамлин. Возникновение дупликаций в регионе 5S-рДНК ранее отмечалось и у других видов. В частности, Сколз и др. [48], анализируя последовательности 5S-рДНК некоторых злаков, описывают наличие дупликаций как в кодирующей части мономера, так и в нетранскрибируемом спейсере.

Пытаясь объяснить, каким образом появляются наблюдаемые ими дупликации и делеции, авторы выдвигают гипотезу, которая основывается на ошибках репликации в данной области из-за наличия близко расположенных друг к другу идентичных коротких мотивов (TTGGG и ATGGG). В дуплицированном начале последовательности L19 таких мотивов найдено не было, но были обнаружены шесть мотивов СТТТТ в положениях 4_8, 11_15, 36_40, 43_47, 63_67 и 85_89 п.о., которые вероятно могли бы стать причиной запуска механизма, идентичного описанному Сколзом и др. [48].

Среди секвенированных NTS мандарина большинство относилось к классу NTS_218 с вариацией длины в пределах 217–222 п.о. (мандарин иволжистый – три последовательности 217 п.о. (L57, L59, L60); сорт Карликовый Уншиу – пять последовательностей 218 п.о., одна 220 п.о. (L61_1, L61_2, L62, L64, L67, L69); сорт Тиахара – две последовательности 221 п.о. (L77, L83) и две последовательности 222 п.о. (L78, L84); сорт Уншиу – одна последовательность 217 п.о. (L90)). Клон L61 содержал вставку длиной 808 п.о., включающую в себя, кроме частей гена 5S-rРНК по краям, два целых гена и два NTS. Такой результат стал возможным благодаря тому, что массивы 5S-рДНК представляют собой tandemные повторы и с помощью универсальных праймеров на их матрице могут амплифицироваться фрагменты, содержащие два мономера и более (схема такой амплификации представлена, например, в работе Александрова и др. (2018) [26]). Особенностью NTS сорта Тиахара являлся мотив GAAT в положении 28_31 п.о. (приложение, Б). Выравнивание всех полученных NTS мандарина показало, что у остальных NTS вместо данного мотива присутствует мотив CC. Выявленный полиморфизм может послужить основанием для разработки специфичных молекулярных маркеров, позволяющих идентифицировать сорт мандарина Тиахара.

Последовательности L68 и L70 сорта Карликовый Уншиу относились к классу NTS_381. Выравнивание данных последовательностей с L14 апельсина сорта Гамлин показало, что 38-нуклеотидные участки 15_52 и 178_215 L68 полностью идентичны таковым у L14, а участок 178_215 L70 не имеет описанной выше замены G/A и полностью идентичен участку 15_52 L14. Однако участок 15_52 L70 имел три замены (две G/A на 8 и 23 п.о. данного участка и одна C/T на 33 п.о. данного участка).

Поиск характерных мотивов в NTS апельсина и мандарина. В ранее опубликованных работах было отмечено, что начальные участки NTS 5S-рДНК часто содержат поли-Т-мотивы [28, 44–47]. Такие мотивы были найдены в 16-17-нуклеотидных начальных участках обоих классов изучаемых NTS апельсина и мандарина. Среди последовательностей класса NTS_218 наиболее распространенным

был вариант C₁T₁C₂T₄A₁T₁C₁T₄ (обнаружен у 17-ти NTS_218, частота встречаемости 80,96%). В единичных NTS этого класса также встречались варианты T₃C₁T₄A₁T₁C₁T₄, C₁T₁G₁C₁T₄A₁T₁C₁T₄, C₁T₂C₁T₅A₁T₁C₁T₄ и C₁T₁C₁T₅A₁T₁C₁T₄ (частота встречаемости каждого из них составила 4,76%). Последний вариант также встречался во всех трех секвенированных последовательностях класса NTS_381.

Анализ секвенированных NTS апельсина и мандарина также показал, что поли-Т-мотивы встречаются не только в начальных 16-17-нуклеотидных участках (приложение). Все NTS_381 содержали T₆-мотив в положении 102_107 п.о.; T₅-мотивы в положениях 54_58, 124_128 и 145_149 п.о.; T₄-мотивы в положениях 32_35, 135_138, 195_198, 217_220 п.о. Кроме того, дополнительные поли-Т-мотивы встречались в отдельных последовательностях NTS_381: T₇ в положении 160_166 п.о. у L14 и L68; T₅ в положении 54_58 п.о. у L14 и L70; T₄ в положениях 117_120, 130_133 и 160_163 п.о. у L70. Последовательности класса NTS_218 не содержали T₇-, T₆- и T₅-мотивы, но имели T₄-мотивы в положении 32_35 п.о. (33_36 п.о. у L61_2; 34_37 п.о. у L77, L78, L83 и L84) и 54_57 п.о. (у всех, кроме L13; в положении 55_58 п.о. у L61_2; 56_59 п.о. у L77 и L83; 57_60 п.о. у L78 и L84). Дополнительные T₄-мотивы встречались в положении 51_54 п.о. у L78 и L84, а также 73_76 п.о. у L59 (74_77 п.о. у L61_2). Наличие поли-Т-мотивов не только в начале NTS, но и в иных участках ранее было описано также и для NTS разных видов семейства Elaeagnaceae L. [28]. Функции данных мотивов не вполне ясны, но можно сделать предположение, что в случае мутационных изменений внутри участка «конец гена 5S рРНК/начало NTS» наличие поли-Т-мотивов ниже по цепи может обеспечить синтез иных РНК-продуктов.

Возможно также влияние поли-Т-мотивов (точнее, соответствующих им полиадениновых блоков в антипараллельной цепи) на физический изгиб молекулы ДНК NTS, что может быть важно для формирования конститутивного гетерохроматина. Ранее у различных видов эукариот было выявлено наличие изгибов ДНК сателлитных повторов конститутивного гетерохроматина [49–52]. Определяющая роль полиадениновых блоков в появлении изгибов ДНК, в свою очередь, была подтверждена в экспериментах по сайт-направленному мутагенезу у табака [53] и сравнительными исследованиями на таких видах, как *C. limon*, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Ricinus communis* L. и др. [54, 55].

Помимо поли-Т-мотивов в NTS апельсина и мандарина были обнаружены поли-Г-мотивы (приложение). У всех секвенированных NTS_381 было выявлено несколько таких мотивов: G₆-мотив в положении 341_346 п.о.; G₅-мотив в положении 95_99 п.о. и четыре G₄-мотива в положениях

252_255 п.о., 261_264 п.о. (отсутствует у L70), 280_283 п.о. и 287_290 п.о. Большинство же последовательностей класса NTS_218 содержало G₆-мотив в положении 178_183 п.о. и несколько G₄-мотивов, которые встречались не во всех последовательностях сразу. У некоторых NTS_218 G₆-мотиву соответствовали мотивы с большим или меньшим количеством G (G₇-мотив в положении 176_182 п.о. у L16; G₅-мотив в положении 178_182 п.о. у L59; G₄-мотив в положении 178_181 п.о. у L61_1). У NTS мандарина сорта Тиахара G₆-мотив был смещен ниже по цепи и находился в положении 181_186 п.о. у L77 и L83 или в положении 182_187 п.о. у L78 и L84. О роли поли-G-мотивов в NTS трудно утверждать однозначно, но можно предположить их вклад в обеспечение сохранности такой жизненно важной структуры, как 5S-рДНК. В нескольких работах встречается мнение, что длинные последовательности из гуаниновых нуклеотидов являются сенсорами повреждения ДНК, так как ряд агентов (прежде всего окислителей) при повреждении воздействуют именно на поли-G-последовательности [56, 57]. Кроме того, окисление или иная модификация G-мотивов в промоторной области могут влиять на регуляцию экспрессии, являясь частью эпигенетических механизмов [58–62]. Конечно, данные выводы актуальны в большей степени для случаев, когда речь идет о работе РНК-полимеразы II, регуляторные элементы которой находятся выше по цепи относительно транскрибируемого гена. Транскрипция же 5S-рРНК осуществляется РНК-полимеразой III, регуляторные последовательности которой находятся внутри самого гена 5S-рРНК.

Помимо поли-G-мотива в NTS 5S-рДНК часто имеются и другие регуляторные последовательности. Например, в положении -25—-30 п.о. с конца NTS встречаются ТАТА-подобные мотивы (ТАТА-бокс необходим для регуляции работы РНК-полимеразы II) [17, 28, 43]. В изучаемых в данной работе 24 NTS канонической последовательности ТАТА-бокса (ТАТА^A/_TА^A/_T) найдено не было. Однако в зоне -25—-30 п.о. с конца NTS ТАТА-подобные мотивы были обнаружены: АТТАА — во всех четырех NTS мандарина сорта Тиахара; GTТАА — в остальных последовательностях класса NTS_218 и последовательностях L14 и L68 класса NTS_381; СТТАА — последовательности L70 класса NTS_381. Факт наличия таких мотивов позволяет выдвинуть гипотезу о том, что ранее, до превращения ТАТА-боксов в ТАТА-подобные мотивы, последовательности 5S-рРНК могли синтезироваться и РНК-полимеразой II. Факт же наличия серьезных мутационных изменений, приведших к образованию ТАТА-подобных мотивов, подтверждает независимость РНК-полимеразы III от наличия или сохранности ТАТА-бокса, в то время как даже однуклеотидные замены в ТАТА-боксе могут при-

вести к существенному снижению эффективности работы РНК-полимеразы II [63].

У некоторых видов (тополь дельтовидный, облепиха, чечевица, несколько видов рыб) имеется такая особенность NTS, как наличие внутри их последовательностей микросателлитных мотивов [29–35, 64]. Поиск микросателлитов в NTS апельсина и мандарина показал отсутствие в них зрелых микросателлитных субповторов. Почти во всех случаях отмечались лишь двукратные повторения микросателлитных мотивов. Только у последовательности L61_1 в положении 57_62 п.о. было отмечено троекратное повторение микросателлитного мотива TG. Данный мотив также был единственным динуклеотидным из 83 найденных (частота встречаемости 1,21%). Остальные были три- (CCG, GCG, ATC, GGT, TCG, TCC, CTT, TTG, GGA, GCC, ATT, ACT), тетра- (TGCG, GGAT, CGGC, CGAC, GGGA) или гексануклеотидными (CGCGGG), с частотами встречаемости 67,47%, 27,71% и 3,61% соответственно (пентануклеотидных мотивов найдено не было). Вполне возможно, что найденные «зарождающиеся» микросателлиты, находящиеся в самом начале своего эволюционного пути, являются неким резервом изменчивости NTS и могут впоследствии расширяться за счет увеличения числа копий мотивов вследствие различных мутационных процессов (проскальзывание фермента при репликации, ошибки при кроссинговере и др.) [65, 66].

Заключение

В данной работе были секвенированы и изучены 24 последовательности NTS 5S-рДНК одного сорта апельсина и четырех сортов мандарина. Последовательности были разделены на два класса (NTS_318 и NTS_218), так как между ними имелись существенные отличия как по длине, так и по внутренней структуре. Поиск различных ДНК-мотивов (поли-T-, поли-G-, ТАТА-подобные и микросателлитные мотивы) выявил некоторые особенности изучаемых NTS. Полученные результаты являются очередным шагом на пути расширения теоретического понимания природы NTS в целом, а также знания о строении NTS у близкородственных видов и могут найти практическое применение при анализе гибридов и сортов цитрусовых, включающих генетический материал апельсина и мандарина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-16-00234 «Молекулярно-цитогенетическое изучение рода Цитрус (*Citrus*) для использования в селекции»). Работы проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu G.A., Terol J., Ibanez V., et al. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. *Nature*. 2018;554(7692):311–316.
2. Жбели А., Сорокопудов В.Н. Перспективы выращивания цитрусовых культур в Сирии. *Вест. Ланд. Арх*. 2021;28:18–21.
3. Budiarto R., Pratita D. *Citrus* export performances of Southeast Asian Countries: A comparative analysis. *Teknotan*. 2022;16:7–12.
4. Kapuya T., Chinembiri E.K., Kalaba M.W. Identifying strategic markets for South Africa's *Citrus* exports. *Agrekon*. 2014;53(1):124–158.
5. Márquez O., Borda R.C., Márquez F., Bravo L.R. Production and export of peruvian mandarin to the Russian Federation market, as a business opportunity, period 2013–2017. *J. Glob. Manag. Sci*. 2018;1(1):22–29.
6. Lachman J., Tacsir E., Pereyra M. Public–private cooperation and the provision of public goods for lemons and citrus exports from Argentina and Uruguay. *J. Agribus. Dev. Emerg. Econ*. 2022;12(4):604–619.
7. *The Citrus Genome*. Eds. A. Gentile, S. La Malfa, Z. Deng. Cham.: Springer Nature Switzerland AG; 2020. 294 pp.
8. Gmitter F.G., Chen C., Machado M.A. de Souza A.A., Ollitrault P., Froehlicher Y., Shimizu T. Citrus genomics. *Tree Genet. Genomes*. 2021;8(3):611–626.
9. Su H.J., Hogenhout S.A., Al-Sadi A.M., Kuo C.H. Complete chloroplast genome sequence of Omani Lime (*Citrus aurantiifolia*) and comparative analysis within the Rosids. *PloS One*. 2014;9(11):e113049.
10. Xu Q., Chen L.L., Ruan X. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat. Genet*. 2013;45:59–66.
11. Sun L., Nasrullah, Ke F., Nie Z., Wang P., Xu J. Citrus genetic engineering for disease resistance: past, present and future. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(21):5256.
12. Moraleva A.A., Deryabin A.S., Rubtsov Yu.P., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 60S Subunit. *Acta Naturae*. 2022;14(2):39–49.
13. Барков А.Н., Трубникова Е.В., Стабровская Н.В. Молекулярные особенности организации и транскрипции рибосомных генов. *Уч. зап. Эл. Науч. Журн. КГУ*. 2007;1:54–73.
14. Little R.D., Braaten D.C. Genomic organization of human 5 S rDNA and sequence of one tandem repeat. *Genomics*. 1989;4(3):376–383.
15. Petrová I., Fajkus J. The rDNA loci – intersections of replication, transcription, and repair pathways. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(3):1302.
16. Wicke S., Costa A., Muñoz J., Quandt D. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2011;61(2):321–332.
17. Sastri D.C., Hilu K., Appels R., Lagudah E.S., Playford J., Baum B.R. An overview of evolution in plant 5S DNA. *Pl. Syst. Evol*. 1992;183(3–4):169–181.
18. Yang Y.W., Tseng P.F., Tai P.Y., Chang Ch.J. Phylogenetic position of *Raphanus* in relation to *Brassica* species based on 5S rRNA spacer sequence data. *Bot. Bull. Acad. Sin*. 1998;39(3):153–160.
19. Brown G.R., Carlson J.E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18s–5.8s–26s rRNA and 5s rRNA in two species of spruce (*Picea*). *Theoret. Appl. Genet*. 1997;95(1–2):1–9.
20. Liu Z.L., Zhang D., Wang X.Q., Ma X.F., Wang X.R. Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines. *Am. J. Bot*. 2003;90(1):17–24.
21. Matyáček R., Fulneček J., Lim K.Y., Leitch A.R., Kovarik A. Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae). *Genome*. 2002;45(3):556–562.
22. Baum B.R., Edwards T., Johnson D.A. Codependence of repetitive sequence classes in genomes: phylogenetic analysis of 5S rDNA families in *Hordeum* (Triticeae: Poaceae). *Genome*. 2010;53(3):180–202.
23. Alexandrov O.S., Karlov G.I. Development of 5S rDNA-based molecular markers for the identification of *Populus deltoides* Bartr. ex-Marshall, *Populus nigra* L., and their hybrids. *Forests*. 2018;9(10):604.
24. Alexandrov O.S., Karlov G.I. The development of *Populus alba* L. and *Populus tremula* L. species specific molecular markers based on 5S rDNA nontranscribed spacer polymorphism. *Forests*. 2019;10(12):1092.
25. Alexandrov O.S., Karlov G.I. The development of new species-specific molecular markers based on 5S rDNA in *Elaeagnus* L. species. *Plants*. 2021;10(12):2713.
26. Alexandrov O.S., Divashuk M.G., Karlov G.I. Development of the St/J/Vgenome specific molecular marker on basis of 5S-rDNA polymorphism. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2018;73(1):18–23.
27. Alexandrov O.S., Kroupin P.Yu., Karlov G.I., Divashuk M.G. The improvement of the CAPS-marker for St, J and V subgenome identification in Triticeae tribe plants using the 5S non-transcribed spacer polymorphism. *Res. Crops*. 2024;25(1):12–19.
28. Alexandrov O.S., Razumova O.V., Karlov G.I. A comparative study of 5S rDNA non-transcribed spacers in Elaeagnaceae species. *Plants*. 2021;10(1):4.
29. Negi M.S., Rajagopal J., Chauhan N., Cronn R., Lakshmikumaran M. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. *Genome*. 2002;45(6):1181–1188.
30. Fernández M., Ruiz M.L., Linares C., Fominaya A., Pérez de la Vega M. 5S rDNA genome regions of *Lens* species. *Genome*. 2005;48(5):937–942.
31. Cruz V.P., Oliveira C., Foresti F. An intriguing model for 5S rDNA sequences dispersion in the genome of fresh water stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Mol. Biol*. 2015;49(3):466–469.
32. Campo D., Machado-Schiaffino G., Horreo J.L., Garcia-Vazquez E. Molecular organization and evolution of 5S rDNA in the genus *Merluccius* and their phylogenetic implications. *J. Mol. Evol*. 2009;68(3):208–216.
33. Deiana A.M., Cau A., Salvadori S., Coluccia E., Cannas R., Milia A. Tagliavini J. Major and 5S ribosomal sequences of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Perciformes, Centrarchidae) are localized in GC-rich regions of the genome. *Chromosome Res*. 2000;8(3):213–218.
34. Moran P., Garcia-Vazquez E. Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology. *Biochem. Mol. Biol. Educ*. 2006;34(2):121–124.

35. Gornung E., De Innocentilis S., Annesi F., Sola L. Zebrafish 5S rRNA genes map to the long arms of chromosome 3. *Chromosome Res.* 2000;8(4):362.
36. Williamson R., Brownlee G.G. The sequence of 5S ribosomal RNA from two mouse cell lines. *FEBS Lett.* 1969;3(5):306–308.
37. Bhatia S., Singh K., Jagannathan V., Lakshmikumar, M. Organization and sequence analysis of the 5S rRNA genes in *Brassica campestris*. *Plant Sci.* 1993;92(1):47–55.
38. Fernández-Tajes, J., Méndez, J. Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J. Agr. Food Chem.* 2007;55(18):7278–7282.
39. Falistocco E., Passeri V., Marconi G. Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. *Genome.* 2007;50(10):927–938.
40. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1990;12(1):13–15.
41. Razumova O.V., Alexandrov O.S., Divashuk M.G., Sukhorada T.I., Karlov G.I. Molecular cytogenetic analysis of monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars reveals its karyotype variations and sex chromosomes constitution. *Protoplasma.* 2016;253(3):895–901.
42. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. [Электронный ресурс] URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/ebinet.htm> (дата обращения: 09.08.2024).
43. Wilson N. *Genome analysis of Populus species: assessment of genetic diversity of P. deltoides, characterization of wide hybrids and phylogenetic analysis using molecular markers*. New Delhi: Teri University, 2013. 177 pp.
44. Baum B.R., Bailey L.G. The 5S rDNA units in *Kengyilia* (Poaceae: Triticeae): Diversity of the nontranscribed spacer and genomic relationships. *Can. J. Bot.* 2000;78(12):1571–1579.
45. Baum B.R., Edwards T., Johnson D.A. Diversity within the genus *Elymus* (Poaceae: Triticeae) as investigated by the analysis of the nr5S rDNA variation in species with St and H haplomes. *Mol. Genet. Genomics.* 2015;290(1):329–342.
46. Baum B.R., Johnson D.A. The molecular diversity of the 5S rRNA gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome.* 1994;37(6):992–998.
47. Baum B.R., Edwards T., Johnson D.A. Loss of 5S rDNA units in the evolution of *Agropyron*, *Pseudoroegneria*, and *Douglasdeweya*. *Genome.* 2008;51(8):589–598.
48. Scoles G.J., Gill B.S., Xin Z.-Y., Clarke B.C., McIntyre C.L., Chapman C., Appels R. Frequent duplication and deletion events in the 5S RNA genes and the associated spacer regions of the Triticeae. *Pl. Syst. Evol.* 1988;160(1–2):105–122.
49. Beridze T.G., Tsirekidze N.I., Roitberg M.A. On the tertiary structure of satellite DNA. *Biochimie.* 1992;74(2):187–194.
50. Murphy M.R., Fowlkes D.M., Fitzgerald-Hayes M. Analysis of centromere function in *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic centromere mutants. *Chromosoma.* 1991;101(3):189–197.
51. Martinez-Balbas A., Rodrigues-Campo A., Garcia-Ramirez, M., Sainz J., Carrera P., Aymami J., Azorin F. Satellite DNAs contain sequences that induced curvature. *Biochemistry.* 1990;29(9):2342–2348.
52. Matyasek R., Gazdova B., Fajkus J., Bezděk M. NTRS, a new family of highly repetitive DNAs specific for the T1 chromosome of tobacco. *Chromosoma.* 1997;106(6):369–379.
53. Kralovics R., Fajkus J., Kovařík A., Bezděk, M. DNA curvature of the tobacco GRS repetitive sequence family and its relation to nucleosome positioning. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1995;12(5):1103–1119.
54. Fann J.-Y., Kovarik A., Hemleben V., Tsirekidze N.I., Beridze T.G. Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. *Theor. Appl. Genetics.* 2001;103(10):1068–1073.
55. Alexandrov O.S., Karlov G.I. Molecular cytogenetic analysis and genomic organization of major DNA repeats in castor bean (*Ricinus communis* L.). *Mol. Genet. Genomics.* 2016;291(2):775–787.
56. Murray V. The frequency of poly(G) tracts in the human genome and their use as a sensor of DNA damage. *Comput. Biol. Chem.* 2015;54:13–17.
57. Spiegel J., Adhikari S., Balasubramanian S. The structure and function of DNA G-quadruplexes. *Trends Chem.* 2020;2(2):123–136.
58. Fleming, A.M., Zhou J., Wallace S.S., Burrows C.J. A role for the fifth G-track in G-quadruplex forming oncogene promoter sequences during oxidative stress: do these “spare tires” have an evolved function? *ACS Cent. Sci.* 2015;1(5):226–233.
59. Fleming, A.M., Ding Y., Burrows C.J. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017;114(10):2604–2609.
60. Cogoi S., Ferino A., Miglietta G., Pedersen E.B., Xodo L.E. The regulatory G4 motif of the Kirsten ras (KRAS) gene is sensitive to guanine oxidation: implications on transcription. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(2):661–676.
61. Bielskutė S., Plavec J., Podbevšek P. Impact of oxidative lesions on the human telomeric G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* 2019;141(6):2594–2603.
62. Lee H.T., Bose A., Lee C.Y., Opresko P.L., Myong S. Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(20):11752–11765.
63. Bjornsdottir G., Myers L.C. Minimal components of the RNA polymerase II transcription apparatus determine the consensus TATA box. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(9):2906–2916.
64. Alexandrov O.S., Evtukhov A.V., Kiselev I.I., Karlov G.I. Molecular genetic features of 5S rDNA nontranscribed spacer in *Hippophae rhamnoides* L. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016;71(4):57–60.
65. Животовский Л. А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения. *Инф. Вест. ВГУС.* 2006;10(1):74–96.
66. Anmarkrud J.A., Kleven, O., Bachmann, L., Lifjeld J.T. Microsatellite evolution: Mutations, sequence variation, and homoplasy in the hypervariable avian microsatellite locus HrU10. *BMC Evol. Biol.* 2008;8:138.

Поступила в редакцию 12.08.2024

После доработки 14.10.2024

Принята в печать 27.11.2024

RESEARCH ARTICLE

Study of structural features of 5S rDNA non-transcribed spacers of *Citrus sinensis* and *C. reticulata*

O.S. Alexandrov*, D.V. Romanov

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya 42, 127550 Moscow, Russia
*e-mail: olegsandrov@gmail.com

Orange (*Citrus sinensis*) and mandarin (*C. reticulata*) are economically important agricultural plants grown in many countries of the world, including southern Russia. In this regard, their genetic studies are widely carried out, including both sequencing of individual loci and whole genome sequencing. Some of the most important loci in a genome are the 5S ribosomal RNA gene arrays, which are tandem repeats. Their monomers consist of a conservative 120-nucleotide coding part and a non-transcribed spacer (NTS), which often has different length and sequence in different species. In this work, 8 NTSs of orange (Hamlin variety) and 16 NTSs of mandarin (3 willow-leaved mandarin, as well as 8 Dwarf Unshiu, 4 Tiahara, and 1 Unshiu varieties) were sequenced and studied. The obtained NTSs had different lengths and were divided into two classes – NTS_218 (217–221 bp long) and NTS_381 (381 bp long). The internal structure of NTSs of both classes was studied, including such characteristics as the sequence of the 16–17 bp start region involved in transcription termination and polyadenylation, the presence of poly-T and poly-G motifs, TATA-like motifs at position –25–30 bp from the end of NTS, the presence of microsatellite motifs, etc. The obtained results expand the theoretical understanding of the NTS nature, knowledge of the NTS structure in closely related species and can be used in the analysis of *Citrus* hybrids and varieties bred with the participation of orange and mandarin.

Keywords: orange, mandarin, NTS, poly-T motifs, poly-G motifs, DNA repeats

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-16-00234.

Сведения об авторах

Александров Олег Сергеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Лаборатории клеточной инженерии ФГБНУ ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: olegsandrov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7146-4094>

Романов Дмитрий Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: akabos1987@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7495-7572>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.085.23

Осветительная установка для определения эффективности действия фотосенсибилизаторов в отношении клеточных культур на основе светодиодов высокой мощности

В.Р. Гудкова^{1, *} , Д.А. Гвоздев¹ , Г.В. Цораев¹, А.М. Мойсенович² , Е.Г. Максимов¹ ¹Кафедра биофизики, биологический факультет Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24;²Кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: gudkova.v.r@gmail.com

Разработка лекарственных препаратов включает в себя оценку действия новых соединений на культуры клеток. Для некоторых соединений при такой оценке предполагается дополнительное воздействие на клетки, например, освещение. Целью настоящей работы является создание установки для равномерного облучения клеточных культур в планшетах и определения эффективности новых фотосенсибилизаторов (ФС). Разработанная схема установки позволяет равномерно освещать 96-луночный планшет с облученностью до 76 мВт/см², при этом значения температуры не превышают 43°C, что позволяет использовать ее для активации ФС. Для апробации рабочих режимов установки в качестве модельного объекта использовали цинковый фталоцианин с холиниловыми заместителями (холосенс) и клеточные культуры НЕК-293 или A431. Были определены зависимости выживаемости клеток от времени облучения и концентрации ФС, а также получены изображения флуоресценции химической ловушки активных форм кислорода в клетках, испытывающих окислительный стресс вследствие фотодинамического эффекта ФС. Полученные результаты свидетельствуют о более чем двукратном различии выживаемости между клетками в экспериментальных и контрольных лунках, а также о равномерном освещении всех лунок планшета.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, осветительная установка, фталоцианин, окислительный стресс, активные формы кислорода, флуоресцентная микроскопия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-5

Введение

Онкологические заболевания в настоящее время являются одной из основных причин смертности населения (согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения). Существуют методы лечения, такие как хирургическое удаление новообразований, химиотерапия и радиотерапия. К сожалению, эти методы не лишены недостатков (множество побочных эффектов, неэффективность в отношении метастазов, высокая частота рецидивов) [1–3], поэтому исследователи активно продолжают поиск новых способов лечения. Одним из таких новых способов является метод фотодинамической терапии (ФДТ) [4]. В основе этого метода лежит использование молекулы фотосенсибилизатора (ФС), который при поглощении кванта света способен генерировать активные формы кислорода

(АФК). Образовавшиеся в результате освещения молекулы АФК наносят повреждения раковым клеткам, что в итоге приводит к их гибели. Для лечения онкологических заболеваний пациенту вводится определенное количество ФС, затем область поражения опухолью освещается светом для активации ФС. Основным источником излучения, используемом в ФДТ, является лазер [5, 6], однако в ряде работ доказывается эффективность использования светодиодов в качестве источника излучения [7–11]. В настоящее время существует ряд ФС, использующихся в клинической практике, однако они обладают рядом недостатков, например: низкие значения поглощения в области окна прозрачности биологических тканей, отсутствие сигналов специфической локализации для эффективного накопления в области злокачественных новооб-

разований и др. [12]. Разработка новых Фс, обладающих большей эффективностью и меньшим количеством побочных эффектов [13], должна сопровождаться изучением их действия на клеточных культурах. Так как неотъемлемым компонентом ФДТ является фотоактивация Фс, возникает необходимость создания специализированных осветительных установок для клеточных культур с целью изучения эффективности новых Фс [14–16], поэтому проблема создания осветительной установки остается актуальной. Среди параметров, влияющих на выбор той или иной осветительной установки, можно выделить следующие: доступность компонентов, необходимых для сборки, совместимость с посудой для выращивания клеток, длина волны излучения, равномерность освещения, наличие тепловых эффектов, возможность использования в модифицированной газовой среде. В данной работе мы предлагаем схему осветительной установки на основе светодиодов высокой мощности, а также оцениваем эффективность ее работы в отношении Фс на примере цинкового фталоцианина (Фц).

Материалы и методы

Сборка установки. Общая схема сборки осветительной установки представлена на рис. 1А. Для сборки осветительной установки использовались красные (максимум излучения 660 нм) светодиоды со световым потоком 70 Лм, мощностью до 3 Вт и углом рассеяния 140°. Для выравнивания напряжения в цепи использовались резисторы с сопротивлением 3,6 Ом. Электрическая схема соединений представлена на рис. 1Б. Светодиоды были

собраны в три группы по 8 штук, группы были подключены к цепи параллельно. Монтаж светодиодов производили на медной плате, в целях охлаждения установка дополнялась металлическим радиатором. Каждый светодиод освещал квадрат из четырех лунок планшета (в 96-луночном варианте). Для того чтобы исключить возможность перекрытия световых пятен от разных светодиодов, осветительная установка дополнялась пластиковой рамкой, ограничивающей область излучения светодиода. В качестве источника тока использовали QJ3005T (Ningbo Jiuyuuan Electronic Co., Ltd., Китай).

Для определения границ применимости данной осветительной установки в отношении живых объектов измеряли температуру на дне размещенного над светодиодной платой планшета при различной длительности освещения и различных значениях силы тока. Для измерения использовался контроллер температуры Мегеон 16312 с термодатчиками (Мегеон, Россия). Измерение потока излучения проводили на длине волны 660 нм с помощью сенсора PM 160T (ThorLabs, США).

В данной работе установка тестировалась для освещения клеток в 96-луночном планшете, однако в дальнейшем она может быть использована на культуральных планшетах с другим количеством лунок (24 и 6).

Культура клеток. Эффективность действия установки была исследована на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 и на эмбриональных клетках почки человека линии НЕК-293. В качестве фотосенсибилизатора выступал цинковый Фц с восемью холиниловыми заместителями (холосенс), который был приобретен

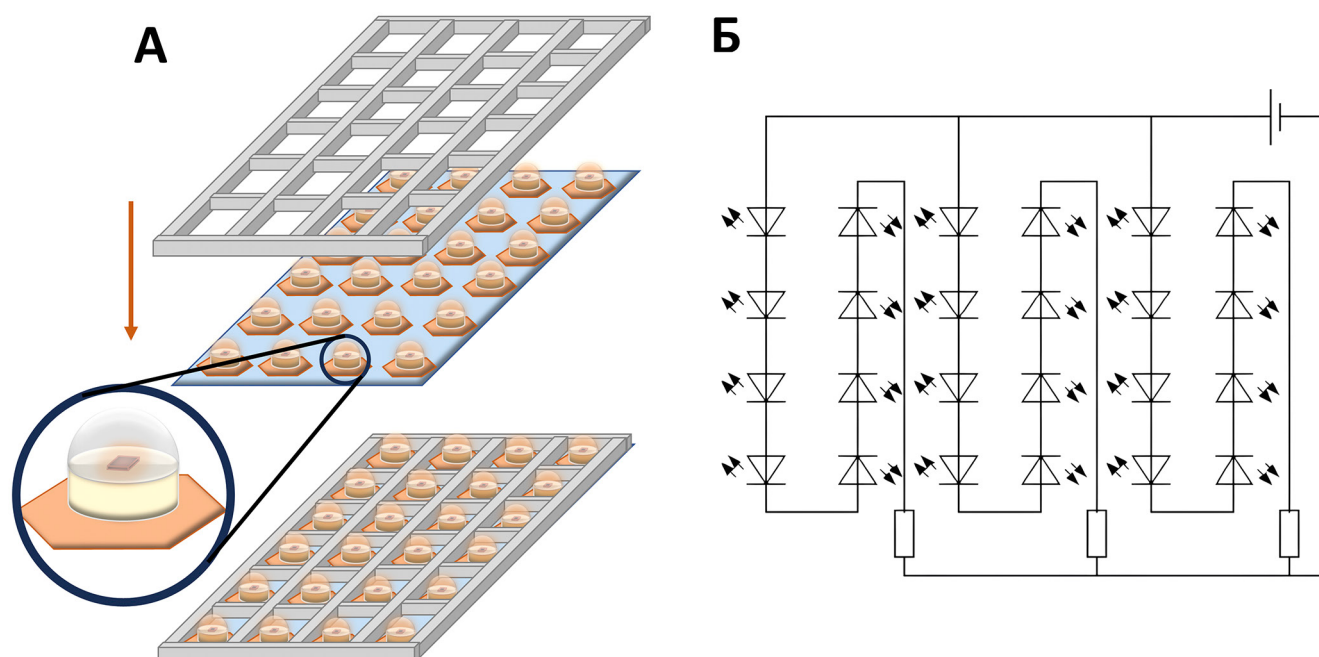


Рис. 1. Основные характеристики осветительной установки. А – схема сборки элементов осветительной установки, Б – электрическая схема компонентов.

в Научно-исследовательском институте органических полупродуктов и красителей (Россия). Для выращивания клеток использовалась среда DMEM/F-12 с 10%-ным содержанием телячьей сыворотки и концентрацией глутамина 2 мМ. Клетки засеивались в 96-луночный планшет с концентрацией ~2 тыс. клеток на лунку и инкубировались в течение 3-х сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и концентрации CO₂ 5%. Реагенты для ведения клеточных культур были приобретены в компании «ПанЭко» (Россия).

Измерение концентрационной зависимости эффекта. Для определения кривой зависимости фотодинамического эффекта от концентрации Фц при освещении на собранной установке в лунки с клетками A431 добавлялся равный объем среды без сыворотки, содержащей Фц в разных концентрациях, так, чтобы значения концентраций Фц в лунках находились в диапазоне от 0 (контроль) до 3 мкМ. Затем планшет инкубировали в течение 30 мин, далее подвергали освещению на собранной установке в течение 3 мин при облученности 76 мВт/см². После этого планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 15 мин. Для оценки выживаемости клеток был проведен МТТ-тест: среду изымали из лунок, далее в лунки добавляли по 100 мкл среды без сыворотки, содержащей МТТ-реагент, планшет инкубировали 4 ч в CO₂-инкубаторе, затем среду изымали из лунок, образовавшиеся на дне лунок кристаллы формазана растворяли в ДМСО. Для оценки выживаемости клеток измеряли оптическую плотность элюата на длине волны 540 нм на планшетном ридере Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария), при анализе оптическую плотность элюата в контрольных лунках (тех, в которых клетки не подвергались воздействию Фц) принимали за 100%-ную клеточную выживаемость.

Кривая зависимости фотодинамического эффекта от концентрации Фц была также измерена на эмбриональных клетках почки человека НЕК-293. Условия инкубации клеток и проведения эксперимента были аналогичными.

Полученные кривые выживаемости имели вид сигмиды. Для аппроксимации использовали уравнение Хилла [17]:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \frac{x_0^p}{x}}, \quad (1)$$

где параметр A_1 соответствует максимальной выживаемости клеток, параметр A_2 — минимальной выживаемости (при данных условиях), параметр x_0 — концентрации Фц, при которой достигается половина от максимально возможного токсического эффекта Фц при данных условиях (полулетальная концентрация), параметр p характеризует скорость снижения выживаемости клеток при увеличении концентрации Фц.

Оценка равномерности освещения планшета.

Для определения равномерности освещения готовили два 96-луночных планшета, в лунки которых добавляли двухкомпонентную химическую ловушку для АФК — имидазол-НДМА — в концентрации 5 мкМ и 25 мкМ соответственно и Фц в концентрации 0,5 мкМ. Один планшет оставляли в качестве контрольного, во всех лунках измеряли оптическую плотность на длине волны 440 нм, далее высчитывали среднее арифметическое по всем лункам. Полученное значение брали за исходное значение оптической плотности в последующих расчетах. Второй планшет подвергали освещению на собранной установке в течение 6 мин при облученности 76 мВт/см², затем во всех лунках измеряли оптическую плотность на длине волны 440 нм. Далее рассчитывали степень фотовыцветания НДМА в каждой лунке по формуле:

$$c = \frac{OP^{6 \text{ мин}}}{OP^{0 \text{ мин}}},$$

где c — степень фотовыцветания, $OP^{6 \text{ мин}}$ — оптическая плотность в лунке планшета после облучения, $OP^{0 \text{ мин}}$ — исходное значение оптической плотности. Оптическую плотность в лунках планшета измеряли на планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG LABTECH, Германия).

Определение дозовой зависимости фотодинамического эффекта. Для выявления зависимости фотодинамического эффекта от дозы света на собранной установке клетки A431 были посеяны в 96-луночный планшет со съёмными рядами (8×1) лунок, после чего следовала инкубация в течение 3-х сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и концентрации CO₂ 5%. Далее в три лунки из каждого ряда была добавлена среда без сыворотки, содержащая Фц в концентрации 1 мкМ. В другие три лунки каждого ряда была добавлена среда без сыворотки в том же объеме, что и в предыдущие лунки, но не содержащая Фц. Оставшиеся две лунки выступали в качестве контрольных (клетки без Фц и питательная среда). Планшет инкубировали в течение 15 мин, затем проводилось освещение при облученности 76 мВт/см², по достижении 90, 120, 180, 240 и 300 с соответствующий ряд изымался из планшета и помещался в темноту. Далее планшет инкубировали в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе, затем проводили МТТ-тест по стандартному протоколу.

Регистрация синглетного кислорода. Для подтверждения участия АФК в гибели клеток, инкубированных с Фц в условиях освещения, использовали ловушку АФК 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат H2DCFDA (Biotium, США). Клетки линии A431 засеивали на чашки Петри диаметром 3,5 см со стеклянным дном в плотности ~20 тыс. клеток/мл. Клетки инкубировались в течение 3 сут. Затем в одну из чашек Петри с клетками добавляли Фц в концентрации 1 мкМ, после чего

клетки инкубировали в течение получаса. Далее клетки во всех чашках Петри дважды промывали средой без сыворотки, затем к клеткам добавляли среду без сыворотки с ловушкой синглетного кислорода в концентрации 10 мкМ, предварительно растворенной в ДМСО (конечное содержание ДМСО в лунке 0,1%). После этого клетки инкубировали в течение 40 мин, затем освещали в течение 3 мин на собранной установке при облученности 76 мВт/см².

Визуализацию флуоресценции H2DCFDA проводили с помощью микроскопа Eclipse Ti2-U (Nikon, США), флуоресценцию возбуждали двухфотонно с помощью фемтосекундного параметрического генератора TOPOL (Avesta Project LTD, Россия) на длине волны 1000 нм, для сканирования образца использовали систему DCS-120 Confocal Scanning FLIM System (Becker & Hickl GmbH, Германия), сигнал регистрировали с помощью детектора HPM-100-40C (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для выявления динамики генерации АФК сделали 25 последовательных кадров, сигнал с каждого накапливали в течение 1 мин. Обработку полученных изображений проводили в программе SPCImage NG (Becker & Hickl GmbH, Германия). Предметом анализа была интенсивность флуоресценции, которую определяли как число фотонов в максимуме кинетики затухания после суммирования фотонов по всем точкам изображения.

Статистическую обработку (стандартное отклонение и тест Колмогорова-Смирнова) и графическое представление результатов экспериментов проводили в программном обеспечении Origin Pro 2019.

Результаты

Температурный эффект от работы установки.

Полученные во время работы осветительной установки значения температуры планшета приведены на рис. 2Б. С увеличением мощности потока излучения увеличивается скорость нагревания планшета. При облученности 76 мВт/см² температура 36°C достигалась за 1 мин инкубации, а температура 50°C — за 6 мин. Для успешной реализации фотодинамической терапии на клетках необходимо соблюсти баланс между дозой света, которая должна быть достаточной для запуска фотодинамических процессов, и температурой в рабочих лунках. На основании полученных результатов для проведения экспериментов на живых клетках было принято решение использовать облученность 76 мВт/см² и время освещения 3 мин. При таком режиме работы температура в клеточной среде не поднимается выше 43°C. Согласно литературным данным, кратковременное воздействие (менее 1 ч) таких температур не приводит к гибели клеток [18]. При этом полученная Фс энергия в размере 4,1 Дж на лунку индуцирует интенсивное выделение АФК, обеспе-

чивающее гибель устойчивых к повреждениям клеточных культур.

Зависимость фотодинамического эффекта от концентрации фталоцианина. На рис. 2А представлена концентрационная зависимость выживаемости клеток A431 и НЕК293 при освещении на собранной установке. Согласно полученным данным, зависимость выживаемости клеток от концентрации Фц имеет вид сигмоидной кривой, которую можно аппроксимировать уравнением (1). Рассчитанные при этом значения параметров представлены на графике (рис. 2А). Значение x_0 для клеточной культуры A431 составило 0,19 мкМ Фц, для клеточной культуры НЕК-293 — 0,14 мкМ. Также мы наблюдали значительные различия в значениях параметра A_2 , который характеризует процент выживших клеток при действии максимальной концентрации Фц. Для клеток линии НЕК-293 он составил 48%, в то время как для линии A431 — 26%.

На рис. 2В представлена временная зависимость выживаемости клеток линии A431 при освещении на установке. Можно наблюдать значительное уменьшение выживаемости клеток в присутствии Фц при увеличении времени освещения. В контроле без Фц выживаемость достоверно снижается только после 100 с облучения.

Равномерность освещения. На рис. 2Г представлены результаты эксперимента по оценке равномерности освещения 96-луночного планшета собранной установкой. Можно наблюдать, что практически во всех лунках планшета наблюдается одинаковая степень выцветания НДМА со средними значениями $0,72 \pm 0,03$. Для полученных значений выцветания была построена гистограмма распределения (рис. 2Д), а также был проведен тест Колмогорова-Смирнова на нормальность распределения. Значение p -критерия теста Колмогорова-Смирнова составило 0,52 — таким образом, принимается нулевая гипотеза о нормальности распределения значений выцветания.

Детекция АФК. На рис. 3 представлены изображения, полученные посредством двухфотонного возбуждения ловушки АФК H2DCFDA. В контрольных клетках линии A431, которые не подвергались освещению на собранной установке, флуоресценции ловушки H2DCFDA не наблюдали, поэтому их изображения не представлены. В клетках, прошедших инкубацию с Фц, в течение 25 мин после освещения регистрировали интенсивную флуоресценцию ловушки АФК, что говорит об их активном выделении (рис. 3А). На полученных изображениях можно наблюдать изменение клеточной морфологии: клетки принимают округлую форму, происходит разрыв мембраны, приводящий к вытеканию клеточного содержимого. В контрольном эксперименте на клетках, подвергшихся освещению на установке в отсутствие Фц, также наблюдается флуоресценция H2DCFDA, однако ее

интенсивность быстро снижается и спустя 2 мин после освещения она не регистрируется (рис. 3Б). На рис. 3В представлена зависимость интенсивности флуоресценции ловушки АФК от времени с момента освещения в клетках, прошедших инкубацию с Фц. С увеличением времени измерения для клеток, освещавшихся в присутствии Фц, интенсивность флуоресценции H2DCFDA увеличивается, что свидетельствует о накоплении АФК и увеличении их концентрации.

Обсуждение результатов

В данной работе предложен способ сборки осветительной установки для облучения 96-луночного планшета на основе 24 светодиодов высокой мощности. Так как многие раковые культуры устойчивы к любому повреждающему действию, в т.ч. фотодинамическому, использование высокой мощности излучения необходимо для быстрого достижения порогового значения запуска процессов клеточной гибели.

Для достижения высоких значений облученности необходимо увеличивать силу тока, подаваемого на осветительную установку, что при длительной работе приводит к нагреву всей системы и планшета в том числе. Отображенная на рис. 2Б зависимость значений температуры от времени

показывает, что для длительного освещения клеток возможно использование облученности 20 и 41 мВт/см², так как при таком режиме работы температура в освещаемом планшете не превышает физиологических значений. Для достижения больших значений энергии излучения за короткое время доступно задействование облученности 76 мВт/см², однако длительное (более 3 мин) освещение клеток при таких значениях облученности может привести к клеточной гибели вследствие высоких температур.

После освещения клеток линии А431 и НЕК-293 на установке в присутствии Фц выживаемость клеток падает (рис. 2А) пропорционально концентрации Фц. При постоянной концентрации Фц токсический эффект увеличивается с увеличением времени освещения (рис. 2В). Таким образом, можно говорить о наличии токсического действия именно со стороны Фц. О фотодинамическом характере эффекта говорят эксперименты с ловушкой АФК. Известно, что при возбуждении Фц осуществляются реакции фотосенсибилизации по второму типу, приводящие к генерации синглетного кислорода [19]. Методами флуоресцентной микроскопии было показано присутствие АФК в образцах клеток, подвергшихся освещению на собранной установке в присутствии Фц (рис. 3А).

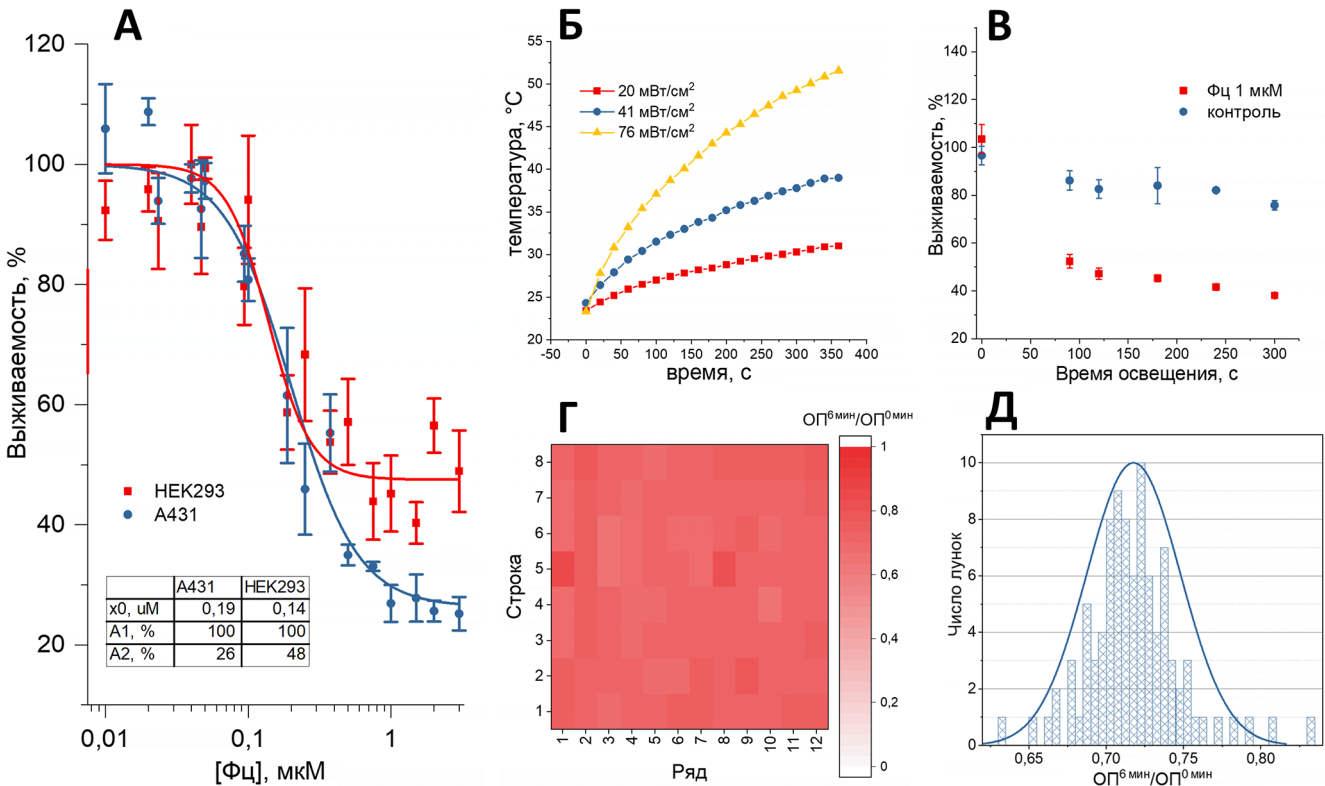


Рис. 2. А — зависимость выживаемости клеток линии А431 и НЕК-293 от концентрации Фц. Облученность 76 мВт/см², время освещения 3 мин. В таблице представлены результаты аппроксимации (согласно уравнению (1)) кривой выживаемости клеток линии А431 и НЕК293 в присутствии Фц в различной концентрации; Б — зависимость температуры в лунках планшета, помещенного на установку, от времени работы при разных значениях облученности; В — зависимость выживаемости клеток линии А431 от времени освещения (в контроле и в присутствии 1 мкМ Фц) при облученности 76 мВт/см²; Г — карта фотовыцветания НДМА в 96-луночном планшете; Д — гистограмма распределения значений фотовыцветания НДМА. Концентрация НДМА 25 мкМ, имидазола 5 мкМ, Фц 0,5 мкМ, облученность 76 мВт/см², 6 мин освещения.

Однако нами было показано, что, несмотря на повышение температуры планшета в процессе освещения, доля погибших клеток в контрольных лунках невелика и не превышает 20%, в отличие от клеток, подвергшихся освещению в присутствии Фц, смертность которых достигает 70% и растет с увеличением времени освещения (рис. 3Б).

Так как основное назначение собранной нами установки — исследовательское, невысокая доля клеточной гибели при длительном освещении не влияет на функциональность установки, так как сохраняется значительный контраст между выживаемостью клеток в контрольных лунках и в лунках с изучаемым Фц. Собранная установка может быть использована не только для оценки фотодинамического действия Фц, но и для определения эффективных действующих концентраций Фц. В частности, наши данные подтверждают известный факт, что клетки раковых линий имеют повышенную общую устойчивость к различным факторам внешней среды по сравнению с нормальными клетками [20]. Аппроксимация полученных кривых выживаемости уравнением сигмоидной кривой показала, что полуметальная концентрация Фц при освещении на установке для клеток линии A431 и НЕК-293 различается (рис. 2А): клетки линии A431 показывают лучшую устойчивость к действию Фц по сравнению с клетками линии НЕК-293. Однако стоит отметить, что, несмотря на низкие значения полуметальной концентрации, значительный процент

клеток линии НЕК-293 оказался нечувствителен к высоким концентрациям Фц (48%). Согласно литературным данным, Фс порфириновой природы, к которым относится Фц, проникают в клетку путем связывания с рецепторами липопротеинов низкой плотности [21]. В клетках раковых опухолей вследствие высокой пролиферативной активности наблюдается повышенная экспрессия таких рецепторов [20], что приводит к более эффективному проникновению Фц в клетки, и, в конечном итоге, к повышенному проценту смертности клеток (74% клеток погибло, 26% оказались нечувствительны). Клетки же линии НЕК-293, напротив, имеют более низкую пролиферативную активность, значительная часть клеток может не иметь путей для проникновения Фц, что может приводить к высокой доле выживших клеток.

Интересно, что генерация АФК клетками в присутствии Фц продолжается и после окончания освещения клеток: флуоресценция ловушки H2DCFDA в этих клетках сохранялась, как минимум, 25 мин после облучения (рис. 3А). Сохранение флуоресценции H2DCFDA в течение столь длительного времени может быть обусловлено нарушением работы естественных антиоксидантных систем клетки. Было также зафиксировано появление флуоресценции H2DCFDA в межклеточном пространстве (начиная с 9-й мин), что свидетельствует о нарушении целостности клеточной мембраны, которое в конечном итоге приводит

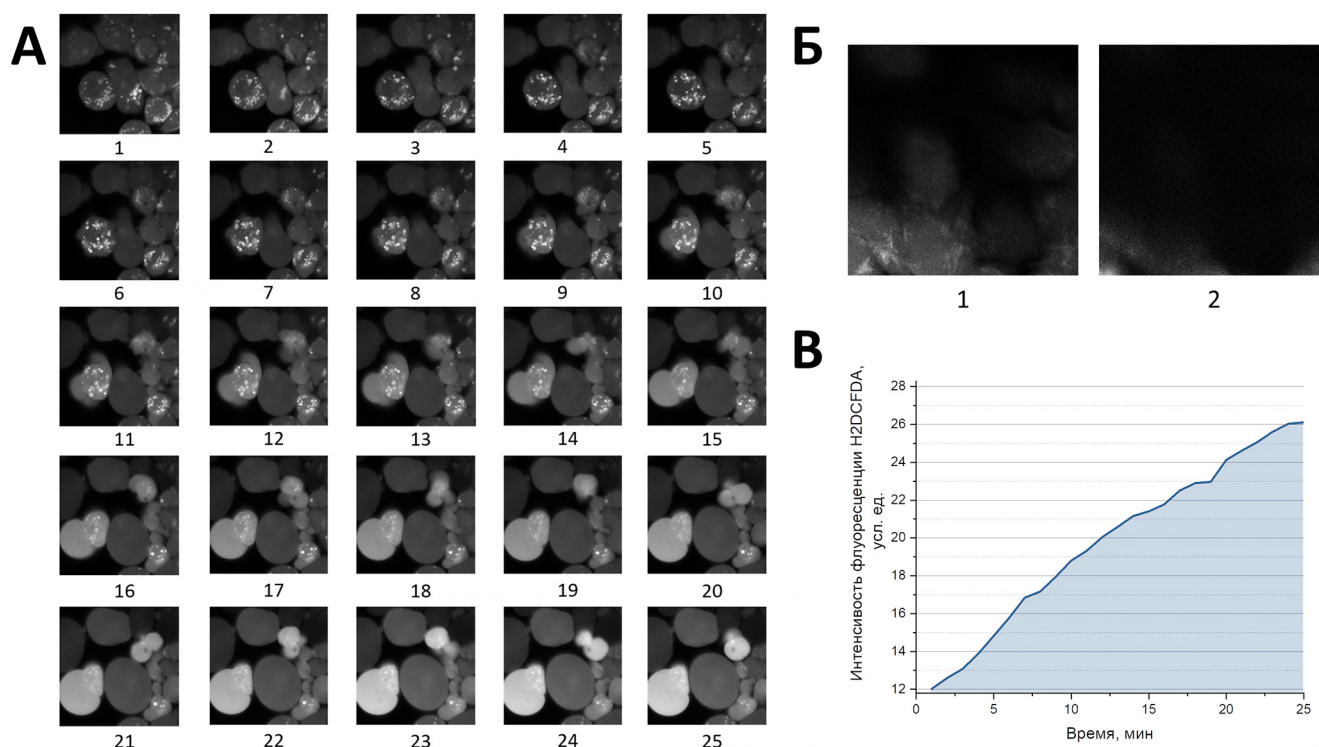


Рис. 3. Последовательно полученные изображения на FLIM-сканирующем микроскопе при накоплении сигнала от флуоресценции H2DCFDA после освещения клеток линии A431 на собранной установке в течение 3 мин (время накопления сигнала — 1 мин на кадр). А — изображения клеток, прошедших предварительную инкубацию с Фц в концентрации 1 мкМ, Б — изображения клеток, не прошедших предварительную инкубацию с Фц, В — интенсивность флуоресценции H2DCFDA в зависимости от времени измерения после освещения при предварительно добавленном Фц.

к клеточной гибели. Картина клеточных повреждений говорит о некротическом пути гибели клеток, что характерно для действия многих агентов ФДТ, в том числе, Фц [21]. Стоит отметить, что флуоресценция ловушки АФК наблюдалась и в клетках, подвергшихся освещению на установке в отсутствие Фц, однако изменения клеточной морфологии при этом не наблюдалось. Кроме того, имеются отличия в интенсивности флуоресценции H2DCFDA: в клетках, прошедших инкубацию с Фц, в первую минуту после освещения было зарегистрировано в среднем в 10 раз больше фотонов флуоресценции, чем в клетках, не прошедших инкубацию с Фц. В клетках, не прошедших инкубацию с Фц, флуоресценция H2DCFDA не детектировалась спустя 2 мин после освещения. Такие данные говорят о меньшей генерации АФК в клетках, подвергшихся освещению на установке. В контрольных клетках (нет Фц и освещения) флуоресценция H2DCFDA при аналогичных параметрах измерения не регистрируется на статистически достоверном уровне. Повышенное по сравнению с контрольными клетками содержание АФК в освещенных клетках в отсутствие Фц может быть обусловлено увеличением температуры установки (рис. 2Б) при длительной работе, а также наличием в клетках эндогенных молекул порфириновой природы, способных обеспечивать естественную фотосенсибилизацию.

Также мы показали, что установка дает однородное освещение для всех лунок 96-луночного планшета. На рис. 2Г представлена тепловая карта полученных нами значений выцветания химической ловушки НДМА после освещения на установке в зависимости от положения лунок, содержащих раствор Фц и имидазола. Добиться абсолютно одинаковых значений выцветания НДМА при оценке фотодинамического действия Фс невозможно в силу ряда причин, среди которых особенности конструкции светодиодов (индивидуальные характеристики полупроводникового кристалла обеспечивают некоторый разброс значений светимости) и ошибка добавления компонен-

тов ловушки. Однако эти факторы приводят к случайным отклонениям, так что конечные значения выцветания должны распределяться нормальным образом вокруг среднего. На рис. 2Д приведена гистограмма распределения значений выцветания НДМА при освещении планшета собранной установкой. При визуальной оценке гистограммы можно увидеть зависимость, характерную для нормального распределения. Также оценка нормальности распределения была проведена аналитически с помощью теста Колмогорова-Смирнова. В данном тесте за нулевую гипотезу принимается гипотеза о нормальности распределения, при значениях p -критерия ниже 0,05 эта гипотеза отвергается. Мы получили значение p -критерия 0,52, что говорит о случайном характере отклонений полученных нами величин от среднего. Исходя из приведенных выше данных, можно сделать вывод о равномерности освещения всех лунок 96-луночного планшета на собранной нами установке.

Закключение

Нами предложена сборка осветительной установки для МТТ-тестов в 96-луночном культуральном планшете. Мы показали, что при освещении клеточных культур линий НЕК-293 и А431 на данной установке в присутствии Фц наблюдается токсический эффект, обусловленный реакцией фотосенсибилизации и образованием АФК. Также мы показали, что собранная нами установка обеспечивает равномерное освещение всех лунок планшета. Таким образом, эта установка может использоваться для изучения действия новых Фс *in vitro*.

Авторы статьи выражают глубокую признательность сотруднику кафедры биофизики Веселину И.В. за неоценимую помощь в создании установки. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 24-24-00125. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gong L., Zhang Y., Liu C., Zhang M., Han S. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. *Int. J. Nanomed.* 2021;16:1083–102.
2. Tilsed C.M., Fisher S.A., Nowak A.K., Lake R.A., Lesterhuis W.J. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front. Oncol.* 2022;12:960317.
3. Wyld L., Audisio R.A., Poston G.J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015;12(2):115–124.
4. Macdonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphy. Phthalocyanines.* 2001;05(02):105–129.
5. Mang T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodyn.* 2004;1(1):43–48.
6. Algorri J. F., Ochoa M., Roldán-Varona P., Rodríguez-Cobo L., López-Higuera J. M. Light technology for efficient and effective photodynamic therapy: a critical review. *Cancers.* 2021;13(14):3484.
7. Dong Y., Zhou G., Chen J., Shen L., Jianxin Z., Xu Q., Zhu Y. A new LED device used for photodynamic therapy in treatment of moderate to severe acne vulgaris. *Photodiagnosis Photodyn.* 2016;13:188–195.
8. Attili S. K., Lesar A., McNeill A., Camacho-Lopez M., Moseley H., Ibbotson S., et al. An open pilot study of ambulatory photodynamic therapy using a wearable

low-irradiance organic light-emitting diode light source in the treatment of nonmelanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 2009;161(1):170–173.

9. Hatakeyama T., Murayama Y., Komatsu S., Shiozaki A., Kuriu Y., Ikoma H., Nakanishi M., Ichikawa D., Fujiwara H., Okamoto K., Ochiai T., Kokuba Y., Inoue K., Nakajima M., Otsuji E. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncol. Rep.* 2013;29(3):911–916.

10. Schmidt M.H., Bajic D.M., Reichert K.W., Martin T.S., Meyer G.A., Whelan H.T. Light-emitting diodes as a light source for intraoperative photodynamic therapy. *Neurosurgery.* 1996;38(3):552–557.

11. Szeimies R.M., Matheson R.T., Davis S.A., Bhatia A.C., Frambach Y., Klövekorn W., Fesq H., Berking C., Reifemberger J., Thaçi D. Topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for multiple actinic keratoses: a randomized study. *Dermatol. Surg.* 2009;35(4):586–592.

12. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem. Rev.* 2015;115(4):1990–2042.

13. Moret F., Reddi E. Strategies for optimizing the delivery to tumors of macrocyclic photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT). *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 2017;21(04–06):239–256.

14. Pieslinger A., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Mair H., Krammer B., Kiesslich T. Characterization of a simple and homogeneous irradiation device based on light-emitting diodes: a possible low-cost supplement to

conventional light sources for photodynamic treatment. *Med. Laser Appl.* 2006;21(4):277–283.

15. Chen D., Zheng H., Huang Z., Lin H., Ke Z., Xie S., Li B. Light-emitting diode-based illumination system for *in vitro* photodynamic therapy. *Int. J. Photoenergy.* 2012;2012(1): 920671.

16. Bajgar R., Pola M., Hosik J., Turjanica P., Cengery J., Kolarova H. New planar light source for the induction and monitoring of photodynamic processes *in vitro*. *J. Biol. Phys.* 2020;46(1):121–131.

17. Di Veroli G. Y., Fornari C., Goldlust I., Mills G., Koh S.B., Bramhall J.L., Richards F.M., Jodrell D.I. An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Sci. Rep.* 2015;5(1):14701.

18. Kassis S., Grondin M., Averill-Bates D.A. Heat shock increases levels of reactive oxygen species, autophagy and apoptosis. *BBA-Mol. Cell. Res.* 2021;1868(3):118924.

19. Sobotta L., Skupin-Mrugalska P., Piskorz J., Mielcarek J. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* 2019;175:72–106.

20. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–674.

21. Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Isat T., Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta. Biochim. Pol.* 2005;52(2):339–352.

Поступила в редакцию 02.07.2024

После доработки 17.10.2024

Принята в печать 04.12.2024

RESEARCH ARTICLE

High-power LED-based light source for photosensitizer efficiency assay against cell culture

V.R. Gudkova^{1,*} , D.A. Gvozdev¹ , G.V. Tsoraev¹,
A.M. Moysenovich² , E.G. Maksimov¹ 

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

²Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: gudkova.v.r@gmail.com

The aim of the work is to develop a light source for uniform irradiation of cell cultures in plates and for determination of the efficiency of new photosensitizers. The designed scheme of the light source provides uniform irradiation of a 96-well plate with irradiance up to 76 mW/cm² with temperature values not exceeding 43°C, which allows to use it for activation of photosensitizers. For approbation of the working modes of the unit, zinc phthalocyanine with cholanyl substituents (cholosens) and cell cultures HEK-293 and A431 were used as a model object. Dependences of cell survival on irradiation time and photosensitizer concentration were determined, and fluorescence images of the marker of reactive oxygen species in cells experiencing oxidative stress due to the photodynamic effect of photosensitizers were obtained. The results show a more than twofold difference in survival between cells in experimental and control wells, as well as uniform illumination of all wells of the plate.

Keywords: photodynamic therapy, light source, phthalocyanine, oxidative stress, reactive oxygen species, fluorescence microscopy

Funding: The research was funded by the Russian Science Foundation, project number 24-24-00125.

Сведения об авторах

Гудкова Виктория Родионовна — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: gudkova.v.r@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-5730-3810>

Гвоздев Даниил Александрович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: danil131054@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3509-7944>

Цораев Георгий Витальевич — науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: gtsoraev@gmail.com

Мойсенович Анастасия Михайловна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-37; e-mail: a-moisenovich@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5379-5829>

Максимов Евгений Георгиевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: emaksimoff@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6767-1501>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.1+616.002+616.002.2

Динамика развития системной воспалительной реакции и нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации церебральных артерий

И.Б. Соколова , В.Н. Шуваева* 

Институт физиологии имени И.П. Павлова, Российская академия наук,
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6
*e-mail: shuvaevavn@infran.ru

Системное хроническое воспаление (СХВ) может развиваться вследствие сахарного диабета, ишемической болезни сердца, атеросклероза, аутоиммунных заболеваний, почечных, печеночных, легочных патологий, онкологии и т.д. В ходе пандемии COVID-19 были получены наглядные доказательства того, что воспаление повреждает эндотелиальные клетки сосудистой стенки с последующим нарушением микроциркуляции. К настоящему времени не выяснены механизмы, приводящие к патологическим изменениям в головном мозге на фоне СХВ. В настоящей работе было исследовано, как отражается развитие системного воспаления на вазодилататорной функции церебральных артерий. Моделирование СХВ было основано на общепринятой модели лигирования и перфорации слепой кишки, которая заключается в перевязке слепой кишки под илеоцекальным клапаном и ее проколе с помощью иглы. Для характеристики полученной модели СХВ у животных фиксировали изменение массы тела и артериального давления, анализировали уровень лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов, показатель гематокрита и степень агрегации эритроцитов в артериальной крови, количество десквамированных эндотелиальных клеток в венозной крови. Исследование плотности сосудистой сети пиальной оболочки и реактивности артерий проводили методом прижизненной визуализации микрососудистого русла. Оценивали число сосудов на единицу площади и изменение диаметра артерий под воздействием вазоактивных веществ: аминоксантидина (блокатор индукцибельной NO-синтазы) и ацетилхолина. В период с 7-х сут до 3-х мес. после начала СХВ уровень лейкоцитов в крови крыс увеличивался в 1,7–2,1 раза по сравнению с контролем. Число десквамированных эндотелиальных клеток увеличилось в 1,8 раза относительно контроля. Агрегируемость эритроцитов повысилась в среднем в 1,3 раза. Плотность сосудистой сети пиальной оболочки уменьшилась в среднем в 1,7 раза. В 1,6–3,1 раза увеличилось число констрикций пиальных артерий под воздействием аминоксантидина. В 1,8–4,9 раза снизилось число расширившихся артерий под воздействием ацетилхолина. Таким образом, развитие СХВ в течение 3 мес. приводит к уменьшению плотности церебральной сосудистой сети и ухудшению вазомоторной функции эндотелиальных клеток мозговых артерий.

Ключевые слова: системное хроническое воспаление, головной мозг, микроциркуляция, церебральные артерии, лейкоциты, эндотелиальные клетки, степень агрегации эритроцитов

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-9

Введение

Системное хроническое воспаление (СХВ) может развиваться вследствие сахарного диабета, ишемической болезни сердца (ИБС), атеросклероза, аутоиммунных заболеваний, почечных, печеночных, легочных патологий, онкологии и т.д. [1–3]. СХВ может стать следствием плохо вылеченных травм или послеоперационных осложнений [4]. СХВ — неотъемлемый процесс старения организма [5]. Если больной успешно преодолевает

острую стадию воспаления, то последствия будут сопровождать его многие месяцы. У больных после перенесенного сепсиса или системного воспаления другой этиологии отмечали нарушение когнитивных функций и повышение риска развития деменции [6, 7]. СХВ усугубляет течение таких мозговых дисфункций, как болезнь Альцгеймера [8]. Показано, что через несколько дней после инициирования системного воспаления в ткани головного мозга подопытных животных повыша-

ется уровень провоспалительных цитокинов, индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и радикалов окислительного стресса [9, 10]. В головном мозге фиксировали активацию микроглии, развитие нейровоспалительной реакции [11, 12]. Однако механизмы нарушения микроциркуляции в головном мозге при СХВ остаются малоизученными. В ходе пандемии COVID были получены наглядные доказательства того, что воспаление повреждает эндотелиальные клетки сосудистой стенки с последующим нарушением микроциркуляции. Если в нейроваскулярной единице нарушены сосудистые функции, то, неизбежно, будут страдать и функции нейрона. В связи с этим необходимо исследовать патологические изменения циркуляции в головном мозге при развитии СХВ, т.к. нарушение церебрального кровоснабжения приводит к развитию ишемических и лакунарных инсультов, когнитивному диссонансу, ускорению атеросклеротических процессов.

Целью настоящей работы стало исследование отражения развития СХВ на вазодилататорной функции церебральных артерий.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar из центра коллективного пользования «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (г. Санкт-Петербург) согласно этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии имени И.П. Павлова РАН (протокол № 10/16 от 16.10.2023). Крыс содержали в стандартных условиях вивария при искусственном освещении (12 ч свет/12 ч темнота) по 6 особей в клетках Т4 при свободном доступе к воде и пище (брикетированный комбикорм ЛБК-120 ГОСТ Р 51850-2001; ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия).

В начале эксперимента возраст животных составлял 3 мес. и, соответственно, в конце — 6 мес. При статистической обработке данных в качестве контрольных значений использовали результаты, полученные на интактных крысах в возрасте 6 мес. Мы сочли возможным использовать только одну контрольную группу, поскольку предварительными экспериментами было установлено, что разница в изменении реактивности пиальных артерий на воздействие ацетилхолина между 3- и 6-месячными животными не так велика, а на воздействие аминоксантина статистически незначима. Дилататорная реакция пиальных артерий на ацетилхолин у 3-месячных крыс более выражена, чем у 6-месячных. Следовательно, если мы получаем статистически значимую разницу между крысами на 7-е, 30-е и 60-е сут после начала СХВ (возраст

крыс при этом составляет 3, 4 и 5 мес.) и контрольными 6-месячными животными, то и с более молодым контролем будут значимые различия.

Модель СХВ. Моделирование СХВ было основано на общепринятой модели лигирования и перфорации слепой кишки (Cecal Ligation and Puncture, CLP) [13], которая заключается в перевязке слепой кишки под илеоцекальным клапаном и ее проколе с помощью иглы. Предварительная стадия работы была посвящена экспериментальному подбору длины перевязанной кишки и диаметру прокола с тем, чтобы животные переживали CLP не менее чем на полгода. Подобранная экспериментальным путем длина перевязанной слепой кишки составляла 2 см, два прокола в данном фрагменте производились иглой диаметром 0,7 мм. Таким образом, нам удалось смоделировать СХВ в организме крысы.

Для характеристики полученной модели СХВ у животных фиксировали массу тела, артериальное давление (АД) прямым измерением через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД; анализировали уровень лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество десквамированных эндотелиальных клеток (ЭК) в венозной крови [14], показатель гематокрита (Ht) и степень агрегации эритроцитов (САЭ) [15]. Ht определяли центрифугированием при 1200 g в градуированных капиллярах, САЭ — в стандартизованной по Ht (40 об.%) артериальной крови в камере Горяева как отношение числа агрегированных клеток к их общему числу в 1 мм³ крови. Уровень лейкоцитов и СОЭ определяли в артериальной крови, взятой из сонной артерии на 3, 7, 21, 30, 60 и 90 сут после CLP по стандартным методикам, описанным в «Лабораторных методах исследования» Предтеченского и соавт. [16], а другие вышеназванные показатели — на 30 и 90 сут. Забор крови в объеме 3 мл проводили через канюлю в сонной артерии или яремной вене в пробирку с антикоагулянтном без использования шприца. Затем из этого объема отбирали пробы для проведения вышеназванных анализов.

Прижизненная микроскопия сенсомоторной коры головного мозга. Через 7, 30, 60 и 90 сут у крыс исследовали реактивность пиальных артерий на орошение поверхности мозга растворами аминоксантина — блокатора iNOS (AG, Aminoguanidine hydrochloride, 1×10^3 M; Sigma-Aldrich, США) или ацетилхолина (ACh, Acetylcholine, 10^{-7} M; Sigma-Aldrich, США) (по 5–6 крыс для оценки каждого вещества и каждого срока СХВ, по 6 контрольных животных). Для этого у наркотизированных крыс (внутрибрюшинно золетил в дозе 20 мг/кг; Virbac, Франция) производили трепанацию черепа в теменной области и удаляли твердую мозговую обо-

лочку. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO₃ – 15,5; MgCl₂ – 1,2; CaCl₂ – 2,5; NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 11,5; рН – 7,4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержали в медицинском водяном термостате (TW-2; SIA «ELMI», Латвия) при температуре +38°C. В течение всего опыта температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C, измеряли среднее АД. С помощью фотокамеры-окуляра DCM-510 (Scopetek, Китай) для микроскопа MC-2ZOOM (Микромед, Россия) в компьютерной программе фиксировали изображение всего фрагмента сосудистой сети и отдельных сосудов. Увеличение на экране компьютера, определенное с помощью стандартного объект-микрометра (ЛОМО, Россия) составляло в первом случае 100×, во втором – 200×. При увеличении 100× на статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии «Photo M» (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) подсчитывали число сосудов на определенной площади. По отношению числа сосудов к площади подсчета получали плотность сосудистой сети (ед/мкм²). Данная программа позволяет автоматически определить площадь выделенной области. За отдельный сосуд принимается участок сосудистого дерева между бифуркациями. Диаметры артерий определяли с помощью этой же программы при увеличении 200×. Степень дилатации (ΔД) оценивали как разность между значениями диаметра после (D₂) и до (D₁) воздействия вазоактивного вещества относительно диаметра сосуда D₁ перед воздействием, %:

$$\Delta D = \frac{D_2 - D_1}{D_1} \cdot 100.$$

Затем на поверхность мозга наносили AG (на 12 мин) или ACh (на 8 мин) и фиксировали диаметры тех же артерий. Если уменьшение или увеличение диаметра превышало 5%, то результат реакции считали значимым и включали в математическую обработку. Контролем служили крысы того же возраста без хирургического вмешательства. Более подробно методика описана ранее [17].

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением программ Microsoft Excel 2003 и InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение двух групп – контроля и одной из точек СХВ – при нормальном распределении (проверка с помощью критерия Колмогорова-Смирнова) проводили с использованием непарного *t*-теста. Достоверным уровнем различий считали вероятность не менее 95% (*p* < 0,05).

Результаты и их обсуждение

В течение первых 7 сут после CLP состояние животных было критическим, масса тела снижалась в среднем на 10% (с 418,6±18,4 до 376,0±6,8 г, *p* < 0,01). В этот период смертность составляла около 30%. В течение последующих 3 мес. погибали только отдельные особи. Уровень лейкоцитов повышался на 3-и сут после CLP в среднем в 2,7 раза относительно контрольных значений и не снижался в течение 3 мес. наблюдения (таблица). Количество ЭК, вязкость плазмы и САЭ (таблица) увеличивались в течение 1 мес. после CLP и оставались на таком же уровне в течение следующих 2 мес. СОЭ была выше контрольных значений в среднем в 1,5 раза в течение первого месяца, затем понижалась до контрольных значений. АД на 7-е сут, через 1, 2, 3 мес. составляло 120±5, 130±3, 125±9, 133±4 мм рт. ст.

Таблица

Лейкоцитоз, агрегация эритроцитов и эндотелиальная дисфункция при развитии СХВ

Крысы в разные сроки СХВ	Показатели			
	Число лейкоцитов в 1 мм ³ плазмы артериальной крови	Вязкость плазмы, относ. ед.	Степень агрегации эритроцитов – число агрегированных клеток, % к общему числу клеток в 1 мм ³ суспензии эритроцитов с Ht = 40 об.%	Число дескваминированных эндотелиальных клеток, ЭК*10 ⁶ /л плазмы венозной крови
3 сут	18542±1061			
7 сут	18579±1510			
21 сут	17856±1274			
1 мес.	18621±2045	1,54±0,08	67,4±1,8	14,22±1,15
2 мес.	17808±2085			
3 мес.	15214±1578	1,53±0,06	68,1±2,0	13,44±1,34
Контрольные крысы	¹⁾ 8731±927***	1 мес: 1,28±0,04** 3 мес: 1,27±0,05*	1 мес: 57,7±2,6* 3 мес: 54,8±3,0**	1 мес: 9,00±1,06** 3 мес: 8,13±0,39*

¹⁾ – в качестве контрольного значения взято среднее арифметическое по всем точкам измерения, поскольку между отдельными результатами не было статистически значимой разницы.

Уровень достоверности различий контрольной группы относительно животных с СХВ: * – *p* < 0,05; ** – *p* < 0,01; *** – *p* < 0,001. Между группами животных в разные сроки развития СХВ статистически значимой разницы не выявлено.

соответственно и статистически значимо не отличалось от АД у контрольных крыс: 126 ± 4 мм рт. ст. Нт также в течение 3 мес. существенно не изменялся и соответствовал значениям у контрольных животных.

О развитии воспаления в головном мозге на фоне СХВ мы можем судить только опосредованно по увеличенной констрикторной реакции пиальных артерий на воздействие АГ (рис. 1). В литературе АГ позиционируется как селективный блокатор iNOS [18, 19]. Концентрации применяемых растворов АГ варьируют от 10^{-4} до 10^{-3} М; АГ вводится как системно в течение нескольких дней, так и используется в качестве вазореактивного агента в острых опытах [18–20]. Результаты нашего исследования показали, что на 7-е сут после CLP число сузившихся под воздействием АГ пиальных артерий возрастает в 1,6–3,1 раза по сравнению с их числом в контрольной группе (рис. 1). В последующие 3 мес. сохраняется примерно такое же соотношение. Следовательно, можно предположить, что дилатация пиальных артерий у животных с СХВ идет по эндотелий-независимому сигнальному пути с участием iNOS. iNOS считается одним из маркеров тканевого воспаления [21, 22]. По данным литературы при воспалении в головном мозге iNOS в основном экспрессируется воспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-1 β (IL-1 β), фактором некроза опухоли α (TNF- α), интерфероном (IFN- γ), липосахаридами, а также макрофагами, астроцитами, активированной микроглией, эндотелиальными и гладкомышечными клетками стенки сосудов и др. [23].

На основании полученных результатов и данных литературы мы можем предположить, что в течение 3 мес. после CLP в головном мозге крыс развивается хроническое воспаление. Высокое

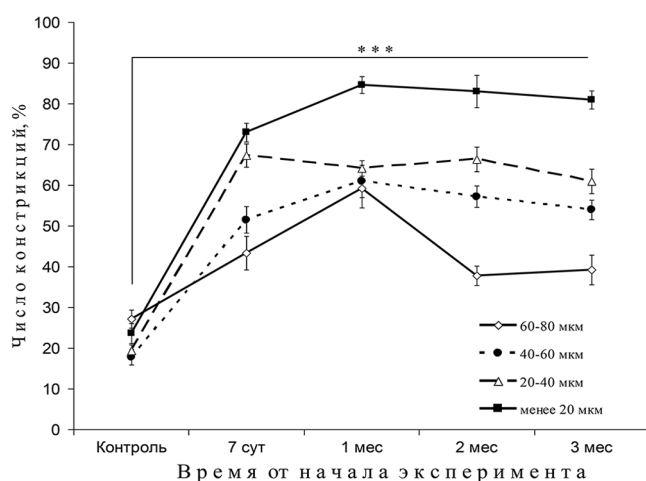


Рис. 1. Констрикция пиальных артерий разных калибров под воздействием амингуанидина. По оси ординат: число констригированных артерий, % от числа артерий соответствующего диаметра. По оси абсцисс: время от начала эксперимента. Данные представлены в виде среднего арифметического $\pm$ ошибки среднего. *** — $p < 0,001$ для всех сроков наблюдения относительно контроля.

содержание NO в ткани приводит к образованию пероксинитрита (ONOO $^-$). В концентрациях, превышающих физиологический уровень, ONOO $^-$ оказывает токсическое действие, повреждая гем, ДНК, клеточные мембраны [24]. Следовательно, iNOS в ткани головного мозга может служить одной из важнейших терапевтических мишеней при лечении СХВ.

Повышенный уровень лейкоцитов, увеличение вязкости плазмы и САЭ в крови при СХВ могут приводить к закупорке мелких сосудов и выведению их из системы микроциркуляции. Указывается, что микрореологические нарушения — в частности, увеличение агрегируемости эритроцитов — приводят к нарушению переноса кислорода в ткани, повышению коагуляции, стимуляции системного воспалительного ответа, что способствует формированию органной дисфункции. Высвобождение кислорода из эритроцита и его диффузия в ткани зависят от САЭ, и протекает тем хуже, чем больше САЭ. Увеличение агрегации сопровождается уменьшением плотности капилляров и ростом сосудистого сопротивления [25].

В представленной экспериментальной работе было выявлено уменьшение плотности сосудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры головного мозга у крыс на 7-е сут после CLP в среднем в 1,7 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 2). В последующие 3 мес. плотность сосудистой сети значимо не изменялась. Можно констатировать, что при развитии СХВ в головном мозге происходит запустевание сосудистого русла и, следовательно, формируются ишемизированные участки ткани. При ряде патологий, сопровождающихся ишемией головного мозга, в ткани наблюдали неангиогенез [26]. Как показали наши результаты, даже через 3 мес. по-

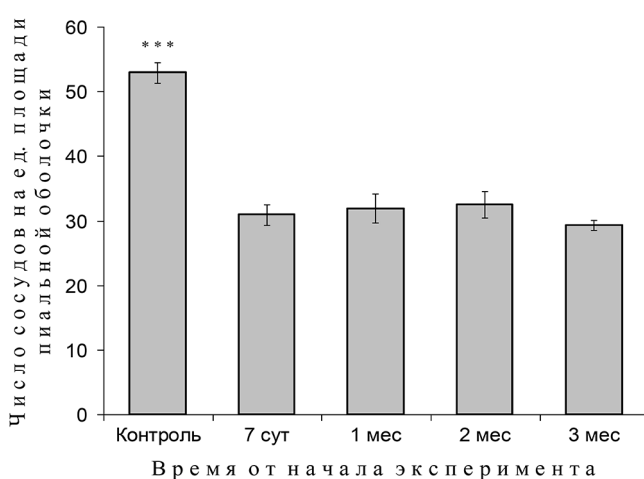


Рис. 2. Плотность сосудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры. По оси ординат: число сосудов на 1 мм 2 площади пиальной оболочки. По оси абсцисс: время от начала эксперимента. Данные представлены в виде среднего арифметического $\pm$ ошибки среднего. *** — $p < 0,001$ для всех сроков наблюдения относительно контроля.

сле запустевания сосудистой сети при СХВ не происходит активации ангиогенеза в ткани головного мозга. Таким образом, стимуляция неоангиогенеза может быть еще одним терапевтическим подходом в лечении последствий СХВ.

При СХВ нарушаются не только структура церебральной сосудистой сети, но и функциональная активность сосудистой стенки. Судить о вазомоторной функции эндотелиальных клеток мозговых артерий можно по дилататорной реакции этих сосудов на воздействие АСh. В представленной работе мы показали, что эндотелий-зависимая дилатация нарушается уже в первые 7 сут после CLP и не восстанавливается в течение последующих 3 мес. (рис. 3). Степень изменения диаметра артерий при воздействии АСh у всех экспериментальных животных была примерно одинаковой (данные не показаны). О повреждении эндотелиального слоя сосудистой стенки свидетельствует и увеличение числа десквамированных ЭК в венозной крови (таблица). Выявлена разница в характере изменения эндотелий-зависимой дилатации у крупных артерий диаметром 60–80 мкм и самых мелких, диаметром менее 20 мкм. У крупных сосудов после CLP в период от 7 сут до 2 мес. дилататорная реакция на АСh сохранялась примерно на одном уровне. К третьему месяцу способность артерий диаметром 60–80 мкм к расширению значительно понижалась. У самых мелких артерий диаметром менее 20 мкм (уровень микроциркуляции) число дилатаций на воздействие АСh значительно уменьшалось через 1 мес. после моделирования СХВ, а затем постепенно повышалось. Но в течение 3 мес. СХВ вазомоторная функция эндотелиальных клеток церебральных артерий не восстановилась до уровня значений у контрольных крыс. Паракринная функция эндотелиальных клеток церебральных сосудов является определяющей для поддержания ауторегуляции

мозгового кровотока [27], предотвращения тромбообразования, патологической клеточной пролиферации и ремоделинга сосудистой сети [28]. При развитии воспалительной реакции эндотелиальные клетки сосудистой стенки, непосредственно контактирующие с кровью, одними из первых повреждаются провоспалительными цитокинами и макрофагами [29]. Следовательно, еще один необходимый этап терапии последствий СХВ – лечение эндотелиальной дисфункции.

Заключение

Результаты представленного исследования показали, что в течение 3 мес. после CLP в организме крыс развивалось системное хроническое воспаление, которое сопровождалось повышением уровня лейкоцитов, увеличением вязкости плазмы и степени агрегации эритроцитов в крови. При этом в головном мозге животных было отмечено увеличение констрикторной реакции пиальных артерий на воздействие амингуанидина, что опосредованно указывает на развитие воспалительной реакции и в ткани головного мозга. Изменения в формуле крови могут приводить к закупорке мелких сосудов и выведению их из системы микроциркуляции, в том числе и в головном мозге. Плотность сосудистой сети пиальной оболочки у крыс с СХВ в первые 7 сут после CLP была в среднем в 1,7 раза меньше, чем у здоровых крыс и в течение 3 мес. не происходило активации тканевого ангиогенеза. Уменьшение плотности сосудистой сети при СХВ приводит к формированию в ткани головного мозга ишемизированных участков. СХВ негативно отразилось и на функциональной активности церебральных артерий: эндотелий-зависимая дилатация нарушалась уже в первые 7 сут после CLP и не восстанавливалась в течение последующих 3 мес. Таким образом, развитие СХВ приводит к уменьшению плотности церебральной сосудистой сети и ухудшению вазомоторной функции эндотелиальных клеток мозговых артерий. Изменения в структуре и реактивности церебральных артерий могут нарушать мозговую ауторегуляцию и метаболический обмен.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН (№1021062411784-3-3.1.8). Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии имени И.П. Павлова РАН (протокол № 10/16 от 16.10.2023). Все международные, национальные и/или институциональные принципы содержания и использования животных были соблюдены. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

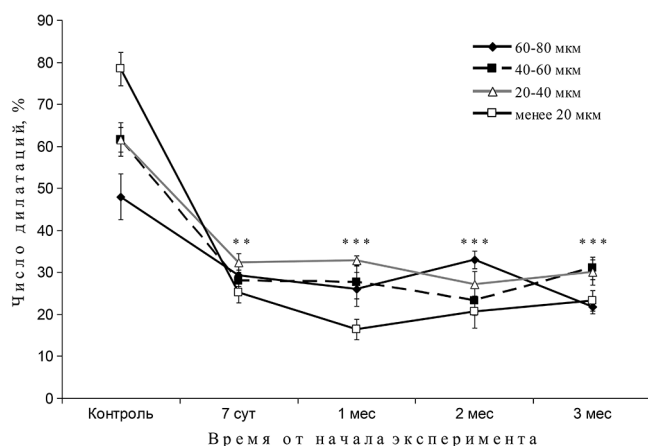


Рис. 3. Дилатация пиальных артерий разных калибров на воздействие ацетилхолина. По оси ординат: число дилатированных артерий, % от числа сосудов соответствующего диаметра. По оси абсцисс: время от начала эксперимента. Данные представлены в виде среднего арифметического $\pm$ ошибки среднего. ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ для всех сроков наблюдения относительно контроля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clària J., Arroyo V., Moreau R. Roles of systemic inflammatory and metabolic responses in the pathophysiology of acute-on-chronic liver failure. *JHEP Rep.* 2023;5(9):100807.
2. Lee K.-S., Yoon S.-H., Hwang I., Ma J.-H., Yang E., Kim R.H., Kim E., Yu J.-W. Hyperglycemia enhances brain susceptibility to lipopolysaccharide-induced neuroinflammation via astrocyte reprogramming. *J. Neuroinflammation.* 2024;21(1):137.
3. Markousis-Mavrogenis G., Pepe A., Lupi A., Apostolou D., Argyriou P., Velitsista S., Vartela V., Quaia E., Mavrogeni S.I. Combined brain-heart MRI identifies cardiac and white matter lesions in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome: A pilot study. *Eur. J. Radiol.* 2024;8(176):111500.
4. Ju Y.-N., Zou Z.-W., Jia B.-W. Ac2-26 activated the AKT1/GSK3 β pathway to reduce cerebral neurons pyroptosis and improve cerebral function in rats after cardiopulmonary bypass. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2024;24(1):266.
5. Otsuka S., Matsuzaki R., Kakimoto S., Tachibe Y., Kawatani T., Takada S., Tani A., Nakanishi K., Matsuoka T., Kato Y., Inadome M., Nojima N., Sakakima H., Mizuno K., Matsubara Y., Maruyama I., Ninjin'yoeito reduces fatigue-like conditions by alleviating inflammation of the brain and skeletal muscles in aging mice. *PLoS One.* 2024;19(5):e0303833.
6. Белобородова Н.В., Острова И.В. Сепсис-ассоциированная энцефалопатия (обзор). *Общая реаниматология.* 2017;13(5):121–139. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2017-5-121-139>.
7. Fruekilde S.K., Bailey C.J., Lambertsen K.L., Clausen B.H., Carlsen J., Xu N.-L., Drasbek K.R., Gutiérrez-Jiménez E. Disturbed microcirculation and hyperaemic response in a murine model of systemic inflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2022;42(12):2303–2317.
8. Lorenzini L., Zanella L., Sannia M., Baldassarro V.A., Moretti M., Cescatti M., Quadalti C., Baldi S., Bartolucci G., Di Gloria L., Ramazzotti M., Clavenzani P., Costanzini A., De Giorgio R., Amedei A., Calzà L., Giardino L. Experimental colitis in young Tg2576 mice accelerates the onset of an Alzheimer's-like clinical phenotype. *Alzheimers Res. Ther.* 2024;16(1):116.
9. Li L., Xing M., Wang L., Zhao Y. Maresin 1 alleviates neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of cecal ligation and puncture. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2024;49(6):890–902.
10. Zhou Y., Deng Q., Vong C.T., Khan H., Cheang W.S. Oxyresveratrol reduces lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress through inactivation of MAPK and NF- κ B signaling in brain endothelial cells. *Biochem. Biophys. Rep.* 2024;40:101823.
11. Yin X.-Y., Tang X.-H., Wang S.-X., Zhao Y.-C., Jia M., Yang J.-J., Ji M.-H., Shen J.-C. HMGB1 mediates synaptic loss and cognitive impairment in an animal model of sepsis-associated encephalopathy. *J. Neuroinflammation.* 2023;20(1):69.
12. Robledo-Montaña J., Díaz-García C., Martínez M., Ambrosio N., Montero E., Marín M.J., Virto L., Muñoz-López M., Herrera D., Sanz M., Leza J.C., García-Bueno B., Figuero E., Martín-Hernández D. Microglial morphological/inflammatory phenotypes and endocannabinoid signaling in a preclinical model of periodontitis and depression. *J. Neuroinflammation.* 2024;21(1):219.
13. Никифорова Л.Р., Крышень К.Л., Боровкова К.Е. Обзор доклинических моделей сепсиса и септического шока. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2021;4:17–28.
14. Петрищев Н.Н., Беркевич О.А., Власов Т.Д., Волкова Е.В., Зуева Е.Е., Мозговая Е.В. Диагностическая ценность определения дескваминированных эндотелиальных клеток в крови. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2001;1:50–52.
15. Вдовин В.А., Муравьев А.В., Певзнер А.А. Способ определения степени агрегации клеток крови. *Ярославский педагогический вестник (Естественные науки).* 2012;III(3):151–154.
16. Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Марголина Л.Т. *Лабораторные методы исследования.* Ред. Л.Г. Смирнова, Л.А. Кост. М.: Медгиз. 1950. 804 с.
17. Sokolova I.B. Effects of metabolic disorders and streptozotocin-induced diabetes on cerebral circulation in rats on a high-fat diet. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(3):915–921.
18. Scott J.A., Machoun M., McCormack D.G. Inducible nitric oxide synthase and vascular reactivity in rat thoracic aorta: effect of aminoguanidine. *J. Appl. Physiol.* 1996;80(1):271–277.
19. Tabernero A., Nadaud S., Corman B., Atkinson J., Capdeville-Atkinson C. Effects of chronic and acute aminoguanidine treatment on tail artery vasomotion in ageing rats. *Br. J. Pharmacol.* 2000;131(6):1227–1235.
20. Misko T.P., Moore W.M., Kasten T.P., Nickols G.A., Corbett J.A., Tilton R.G., McDaniel M.L., Williamson J.R., Currie M.G. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;233(1):119–125.
21. Zamora R., Vodovotz Y., Billiar T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* 2000;6(5):347–373.
22. Галагудза М.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2023;38(1):13–20.
23. Cinelli M.A., Do H.T., Miley G.P., Silverman R.B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med. Res. Rev.* 2020;40(1):158–189. <https://doi.org/10.1002/med.21599>.
24. Abalenikhina Y.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. Peroxynitrite: Toxic agent and signaling molecule. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020;56(6):611–623.
25. Герасимов Л.В., Мороз В.В., Исакова А.А. Микрореологические нарушения при критических состояниях. *Общая реаниматология.* 2010;1(1):74–78.
26. Vallon M., Chang J., Zhang H., Kuo C.J. Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71(18):3489–3506.
27. Evans L.E., Taylor J.L., Smith C.J., Pritchard H.A.T., Greenstein A.S., Allan S.M. Cardiovascular comorbidities, inflammation, and cerebral small vessel disease. *Cardiovascular Res.* 2021;117:2575–2588.
28. Godo S., Shimokawa H. Endothelial functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017;37(9):e108–e114.
29. Ritson M., Wheeler-Jones C., Stolp H.B. Endothelial dysfunction in neurodegenerative disease: Is endothelial inflammation an overlooked druggable target? *J. Neuroimmunol.* 2024;391:578363.

Поступила в редакцию 17.06.2024

После доработки 13.01.2025

Принята в печать 15.01.2025

RESEARCH ARTICLE

Dynamics of development of the systemic inflammatory response and disruption of endothelium-dependent vasodilation of cerebral arteries

I.B. Sokolova , V.N. Shuvaeva* 

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Makarov emb., 6, St. Petersburg, 199034, Russia

**e-mail: shuvaevavn@infran.ru*

Systemic chronic inflammation (SCI) can develop due to diabetes mellitus, coronary artery disease, atherosclerosis, autoimmune diseases, kidney, liver, and lung pathologies, cancer, etc. During the COVID-19 pandemic, there was clear evidence showing that inflammation damages endothelial cells of the vascular wall, leading to impaired microcirculation. Currently, the mechanisms causing pathological changes in the brain amid SCI are still unclear. In this work, we investigated how systemic inflammation affects the vasodilatory function of cerebral arteries. SCI was modeled using the well-established cecal ligation and puncture model, which involves tying off the cecum below the ileocecal valve and puncturing it with a needle. For characterizing the SCI model in animals, we recorded changes in body weight, blood pressure, and analyzed levels of leukocytes, ESR, hematocrit, erythrocyte aggregation in arterial blood, and the number of desquamated endothelial cells in venous blood. The density of the vascular network in the pial membrane and arterial reactivity was studied using in vivo microvascular imaging. The number of vessels per unit area and changes in arterial diameter under the influence of vasoactive substances – aminoguanidine (an inducible NO-synthase inhibitor) and acetylcholine – were measured. From 7 days to 3 months after the onset of SCI, leukocyte levels in rat blood increased by 2.1–1.7 times compared to the control group. The number of desquamated endothelial cells increased by 1.8 times compared to the control. Erythrocyte aggregation rose by an average of 1.3 times. The density of the vascular network in the pial membrane decreased by an average of 1.7 times. The number of constrictions in pial arteries induced by aminoguanidine increased by 1.5 to 3.7 times. The number of arteries that expanded in response to acetylcholine decreased by 1.8 to 4.9 times. Thus, SCI over a period of three months leads to a decrease in the density of the cerebral vascular network and a deterioration in the vasomotor function of endothelial cells in cerebral arteries.

Keywords: *systemic chronic inflammation, brain, microcirculation, cerebral arteries, leukocytes, endothelial cells, erythrocyte aggregation*

Funding: This study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (No. 1021062411784-3-3.1.8).

Сведения об авторах

Соколова Ирина Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: sokolovaib@infran.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7483-1080>

Шуваева Вера Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: shuvaevavn@infran.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-7467>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 615.277.3

Гель-электрофорез как метод классификации ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз 1 и 2

А.А. Лобанова^{1, *}, А.Н. Коровина¹, Д.О. Кошкина¹, П.А. Черникова¹, А.В. Феофанов¹ ,
В.М. Студитский^{1, 2} , Д.К. Нилов³ , Н.В. Малюченко¹

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

²Центр исследований рака Фокс Чейз, США, штат Филадельфия, 19111-2497, г. Филадельфия, Коттман Авеню, д. 333;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 (PARP1 и PARP2) играют важную роль в репарации повреждений ДНК в клетке, а их ингибирование применяется для лечения некоторых онкологических заболеваний. Ведутся активные разработки новых ингибиторов PARP и изучение механизмов их действия. В настоящей работе на примере ингибиторов талазопариба, олапариба и велипариба показано, что электрофорез в полиакриламидном геле комплексов ДНК с PARP1 и PARP2 в присутствии ингибиторов позволяет выявить их влияние на сродство ферментов к ДНК, а после добавления субстрата НАД⁺ — оценить эффективность ингибирования каталитической активности ферментов. Учет данных механизмов действия важен для поиска новых ингибиторов PARP1 и PARP2.

Ключевые слова: PARP, ингибиторы, электрофорез, талазопариб, олапариб, велипариб

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-10

Введение

Ядерные белки поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 (poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2, PARP1 и PARP2) являются важными компонентами систем репарации ДНК [1–4]. Эти ферменты, связываясь с разрывами ДНК, активируются и начинают синтезировать полимеры АДФ-рибозы (poly(ADP-ribose), PAR) путем модификации собственной молекулы и/или соседних белков, используя в качестве донора АДФ-рибозильных групп НАД⁺ [1, 5]. За счет большого отрицательного заряда PAR деконденсируют хроматин в местах повреждений и привлекают факторы репарации ДНК, создавая условия для устранения повреждений ДНК [6–8]. Геном опухолевых клеток нестабилен, он нуждается в активной системе репарации для поддержания целостности ДНК [9]. При развитии онкологических заболеваний высокая активность белков PARP дает опухолевым клеткам преимущество в выживании и повышает устойчивость к проводимой терапии [10]. Несколько синтетических ингибиторов PARP были одобрены для лечения онкологических заболеваний [11]. Они представляют собой низкомолекулярные соединения,

ингибирующие каталитическую активность PARP1 и/или PARP2 за счет конкуренции с субстратом НАД⁺ за связывание в активном центре [12–16]. Известно, что применяемые в клинике ингибиторы способны влиять как на каталитическую активность PARP1 и PARP2, так и на их способность связываться с ДНК [17]. На связывание PARP с ДНК ингибиторы действуют по-разному в зависимости от их структуры и характера связывания в каталитическом домене белка. Соответственно, ингибиторы подразделяются на три типа: усиливающие сродство PARP к ДНК (I тип), не оказывающие влияния на ДНК-связывающую активность белка (II тип) и уменьшающие сродство PARP к ДНК (III тип) [13]. Например, установлено, что применяемые в клинике талазопариб и олапариб в отношении PARP1 являются ингибиторами II типа, а в отношении PARP2 — I типа, в то время как велипариб действует на оба фермента как ингибитор III типа [14].

Ингибиторы, которые действуют по I или II типу (такие, как олапариб), способны избирательно и эффективно блокировать PARP [18], но их применение часто осложняется повышенной ток-

сичностью и развитием резистентности [19–21]. Ингибиторы III типа характеризуются более щадящим воздействием на организм. С учетом данных о том, что ингибирование PARP2 является гематотоксичным [22], ведется поиск селективных ингибиторов PARP1.

Таким образом, при разработке новых ингибиторов, направленных на PARP1, требуется классификация тестируемых соединений по механизмам действия, которую в настоящее время проводят главным образом с применением методов поляризации флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса [13, 14]. Ранее при изучении взаимодействий нуклеосом с PARP1 и его ингибиторами нами было показано, что дополнительными перспективными методами определения типа ингибиторов этого фермента являются микроскопия одиночных частиц на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии и электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях [23].

В настоящей работе мы сообщаем, что для классификации ингибиторов белков PARP может быть использован простой и надежный метод гель-электрофореза [23–26] с использованием ДНК с тупыми концами в качестве активатора фермента, причем метод применим также для классификации ингибиторов PARP2.

Материалы и методы

ДНК. Двухцепочечную ДНК длиной 187 п.н. получали методом полимеразной цепной реакции с использованием плазмиды pTZ57R и олигонуклеотидов (с включенной в состав обратного праймера флуоресцентной меткой Cy5):

Прямой праймер: 5'-AAGCGACACCGGCAC TGGGCCCGGTTCTCGCGCTCCCGCCT TCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGT-3';

Обратный праймер: 5'-AACCATGATGGGCA CTGGGTACCCAGGGACTTGAAG TAATAAG GACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACG G[Cy5-dT]GGTTAG-3' (Lumiprobe, Россия).

Экспрессия и очистка белков PARP1 и PARP2. Рекombинантный белок PARP1 получали, как описано ранее [27]. Рекombинантный белок PARP2, используя методику [28], экспрессировали в бактериальной системе в клетках *Escherichia coli* штамма Rosetta 2 (DE3) pLysS, используя плазмиду pET-28-PARP2, несущую ген PARP2 человека и гексагистидиновый тэг на N-конце. Клетки растили в среде Лурии-Бертани с 10 мМ бензамида и 50 мкг/мл канамицина 4–6 ч до достижения оптической плотности при 600 нм 0,5–0,8 опт.ед./см, выдерживали на льду 1 ч, индуцировали экспрессию PARP2 добавкой изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (0,2 мМ) и ZnCl₂ (100 мкМ), а затем инкубировали 18 ч при 16°C. Клетки осаждали центрифугированием (3200 g, 30 мин при 4°C), а осадок ресуспендировали при 4°C в буфере, содержащем 25 мМ HEPES (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 0,5 мМ трис(2-кар-

боксиил)фосфина (tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP) и 10 мМ бензамида. Клетки лизировали френч-прессом в присутствии 1 мМ фенилметилсульфонил фторида (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 1 мМ бензамидина и смеси ингибиторов протеаз А (0,5 мкг/мл лейпептина, 0,7 мкг/мл пепстатина А, 0,5 мкг/мл антипаина, смесь ингибиторов протеаз P2714; Sigma, США). Лизат центрифугировали 1 ч при 18000 g, а собранный супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

PARP2 предварительно очищали методом металл-аффинной хроматографии на хроматографе AKTA Purifier (Cytiva, США) с колонкой HiTrap Chelating HP (Cytiva, США), содержащей Ni²⁺-сефарозу (GE Healthcare, США). Образец наносили на колонку (2 мл/мин) и промывали буфером А (25 мМ HEPES (pH 8,0), 0,5 мМ TCEP, 0,1% NP40, 1 мМ бензамидина, 1 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз А) с 20 мМ имидазола, содержащим 0,5 М, затем 1М и затем 0,5 М NaCl. PARP2 элюировали буфером А с 0,5 М NaCl и 250 мМ имидазола. Элюат разбавляли буфером Б (50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), 1 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, 1 мМ бензамидин, 0,1 мМ TCEP), понижая концентрацию NaCl до 0,2 М, и подвергали очистке методом аффинной хроматографии на колонке с гепарином HiTrap Heparin HP (GE Healthcare, США). После промывки буфером Б с 0,2 М NaCl PARP2 элюировали с колонки градиентом NaCl (от 0,2 до 1 М в течение 100 мин) в буфере Б. Собранные фракции, содержавшие целевой белок по данным денатурирующего гель-электрофореза, объединяли и концентрировали с помощью концентратора Amicon Ultra (Merck, Германия) с фильтром на 50 кДа, центрифугируя раствор 6500 g, при 4°C. Для удаления твердых частиц раствор центрифугировали при 10000 g.

Окончательно PARP2 очищали методом гель-фильтрации на колонке HiPrep 16/60 Sephacryls-200 HR (Cytiva, США), элюируя его буфером (25 мМ HEPES pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1 мМ TCEP) со скоростью 0,3 мл/мин. Фракции, содержавшие белок по данным денатурирующего гель-электрофореза, объединяли и концентрировали центрифугированием при 13800 g. Белок разбавляли в два раза буфером (40 мМ HEPES (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 0,2 мМ TCEP, 80% глицерина, 0,3 мМ ZnCl₂), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Ингибиторы. Талазопариб, олапариб и велипариб (Selleck, США) растворяли в ДМСО в концентрации 10 мМ и хранили при температуре -20°C.

Подготовка образцов для электрофореза. Все исследования проводили в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 40 мМ NaCl, 0,3 мМ ZnCl₂ и 1 мМ β-меркаптоэтанол (ранее была показана важность использования ионов Zn²⁺ для исследования PARP2 [29]).

ДНК (10 нМ) инкубировали с PARP1 (25 нМ) или PARP2 (50 нМ) в течение 20 мин при 25°C. Для запуска реакции поли(АДФ-рибозил)ирования в пробу добавляли 100 мкМ НАД⁺ (Merck, Германия) и инкубировали смесь в течение 45 мин при 25°C.

В экспериментах с ингибиторами PARP1 или PARP2 образцы преинкубировали с олапарибом (1, 10 или 20 мкМ), велипарибом (1, 5 или 15 мкМ) или талазопарибом (0,5 или 1 мкМ) в течение 15 мин при 25°C и затем инкубировали с ДНК и НАД⁺, как описано выше. Содержание ДМСО в реакционной смеси не превышало 0,2%.

Электрофорез в нативных условиях. Для электрофореза в нативных условиях готовили 4%-ный полиакриламидный гель в 0,2×буфере TBE (3,6 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 3,6 мМ H₃BO₃, 0,08 мМ ЭДТА). Предварительный электрофорез (без проб) проводили при напряжении 140 В и температуре 4°C, пока сила тока не снижалась до 5–8 мА. Затем в лунки вносили пробы с предварительно добавленной сахарозой (5% конечная концентрация) и проводили электрофорез при 120 В (4°C) в течение 60 мин. Гели сканировали лазерным флуоресцентным сканером Amersham Typhoon RGB (GE Healthcare, США), возбуждая и регистрируя флуоресценцию красителя Cy5 в составе ДНК.

Результаты и обсуждение

Анализ взаимодействий PARP1 и PARP2 с ДНК методом гель-электрофореза. Образование комплексов ДНК с PARP1 и PARP2 оценивали по изменению электрофоретической подвижности ДНК в полиакриламидном геле в нативных условиях, детектируя флуоресценцию Cy5-меченной ДНК (свободной и в комплексе с белком).

Измерение электрофоретической подвижности ДНК в присутствии белков PARP показало, что PARP1 и PARP2 концентрационно-зависимым образом взаимодействуют с ДНК. При концентрации PARP1 25 нМ (рис. 1А, дорожка 2) в геле наблюдается появление трех полос, соответствующих

связующих комплексам ДНК–PARP1. Как было показано ранее [30], данные полосы соответствуют комплексам с различным числом молекул PARP1, в которых на молекулу ДНК приходится от одной до трех молекул PARP1. При концентрации PARP1 40 нМ разделение смеси на комплексы с фиксированной стехиометрией ухудшается, по-видимому, из-за связывания дополнительных молекул PARP1 и взаимодействия комплексов между собой (рис. 1А, дорожка 3). При концентрации ≥ 60 нМ большая часть комплексов переходит в самоассоциаты с низкой подвижностью в геле (рис. 1А, дорожка 4). Образование самоассоциатов может быть связано с установленной способностью комплексов PARP1 с ДНК формировать конденсаты за счет взаимодействия молекул PARP1, связавшихся на концах разных молекул ДНК [31]. Концентрационно-зависимое образование комплексов естественно сопровождается уменьшением интенсивности полосы свободной ДНК в геле. Для дальнейших экспериментов с ингибиторами была выбрана концентрация PARP1 25 нМ, при которой на электрофореграмме видны узкие четко изолированные полосы комплексов.

Аналогично был проведен подбор условий комплексообразования для белка PARP2. При концентрации PARP2 25–40 нМ происходит формирование одного-двух типов комплексов с ДНК, отличающихся по подвижности в геле (рис. 1Б, дорожки 2, 3). При концентрации PARP2 50 нМ образуется три типа комплекса (рис. 1Б, дорожка 4), а при 75 нМ наблюдается образование 5–6 типов комплексов, детектируемых как набор дискретных полос в геле (рис. 1Б, дорожка 5). Похожие результаты были получены ранее [24]. Размер PARP2 существенно меньше, чем PARP1, что позволяет большему количеству молекул белка связаться с одной молекулой ДНК. Кроме того, известно, что PARP2 при концентрациях около 100 нМ в присутствии ДНК способен образовывать гомодимеры [32]. Для дальнейших экспериментов был выбран диапазон концентрации PARP2 25–50 нМ.

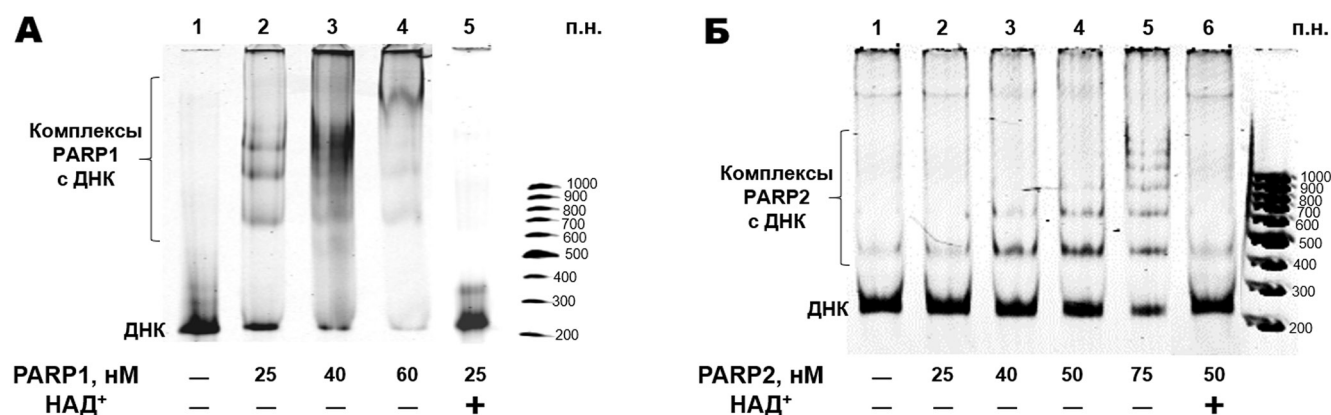


Рис. 1. Исследование взаимодействия белков PARP1 и PARP2 с ДНК длиной 187 п.н. методом гель-электрофореза. А — электрофорез в полиакриламидном геле ДНК (20 нМ), проинкубированной с PARP1 (25, 40 или 60 нМ) и НАД⁺ (100 мкМ), Б — электрофорез в полиакриламидном геле ДНК (20 нМ), проинкубированной с PARP2 (25, 40, 50 или 75 нМ) и НАД⁺ (100 мкМ).

Добавление НАД⁺ к комплексам ДНК–PARP запускает реакцию, сопровождающуюся автополи(АДФ-рибозил)ированием самих ферментов. Образование отрицательно заряженных цепей PAR на поверхности PARP1 и PARP2 приводит к уменьшению сродства белков к ДНК и их диссоциации, что регистрируется в геле как исчезновение полос комплексов и восстановление полосы свободной ДНК – рис. 1А (дорожка 5), рис. 1Б (дорожка 6).

Очевидно, что влияние ингибиторов на сродство PARP1 и PARP2 к ДНК должно приводить к изменению интенсивностей полос свободной ДНК и комплексов ДНК с ферментами в геле в отсутствие НАД⁺, а подавление реакции поли(АДФ-рибозил)ирования ингибиторами должно влиять на степень высвобождения свободной ДНК из комплексов в присутствии НАД⁺.

Классификация ингибиторов PARP методом гель-электрофореза. Исследованы три ингибитора PARP: олапариб, талазопариб и велипариб, которые отличаются по влиянию на сродство PARP1 с хроматином в клетке [1, 13, 33]. Диапазон концентраций ингибиторов выбирали, исходя из ранее полученных нами данных [23].

Анализ данных гель-электрофореза показывает, что талазопариб в концентрации 0,5 и 1 мкМ не влияет на связывание PARP1 с ДНК (рис. 2Г, дорожки 3, 4), но блокирует НАД⁺-опосредованную диссоциацию комплексов ДНК–PARP1 (рис. 2Г, дорожки 6, 7), что указывает на эффективное подавление каталитической активности фермента талазопарибом в этих концентрациях. Согласно этим данным, талазопариб является ингибитором PARP1 II типа.

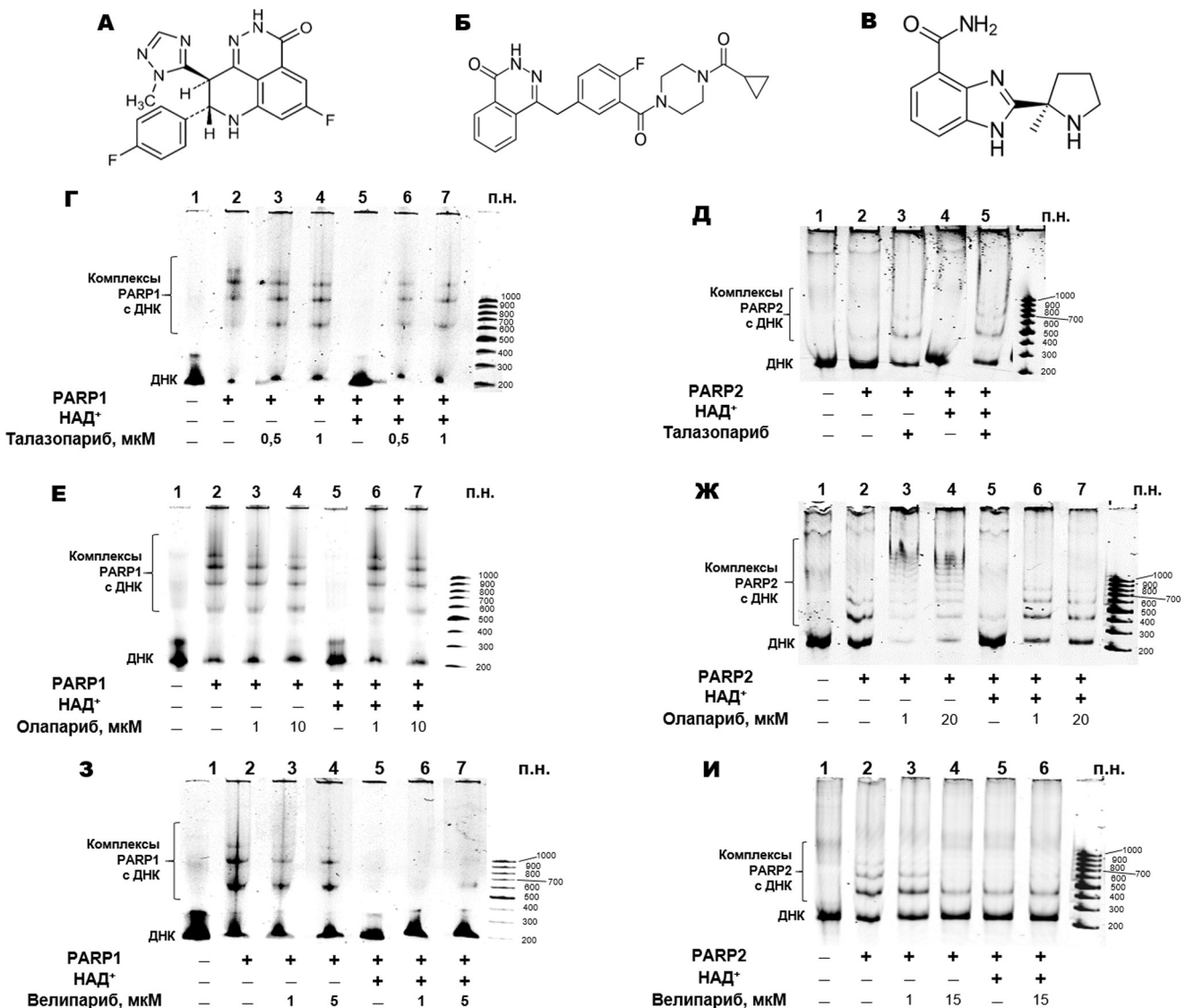


Рис. 2. Влияние ингибиторов на связывание PARP1 и PARP2 с ДНК до и после инкубации с НАД⁺. А, Б, В – Структурные формулы талазопариба, олапариба и велипариба. Г, Е, З – Анализ электрофоретической подвижности ДНК (20 нМ) и ее комплексов с PARP1 (25 нМ) в присутствии НАД⁺ (100 мкМ) и ингибиторов: талазопариба (0,5 и 1 мкМ); олапариба (1 и 10 мкМ) и велипариба (1 и 5 мкМ). Д, Ж, И – Анализ электрофоретической подвижности ДНК (20 нМ) и ее комплексов с PARP2 (25 нМ, 50 нМ и 50 нМ; Д, Ж и И) в присутствии НАД⁺ (100 мкМ) и ингибиторов: талазопариба (1 мкМ); олапариба (1 и 20 мкМ) и велипариба (1 и 15 мкМ).

Талазопариб в концентрации 1 мкМ заметно усиливает образование комплексов PARP2 с ДНК (рис. 2Д, дорожка 3). При добавлении НАД^+ в присутствии талазопариба комплексы PARP2 с ДНК сохраняются, что свидетельствует о подавлении каталитической активности фермента и позволяет классифицировать талазопариб как ингибитор PARP2 I типа.

По данным гель-электрофореза олапариб в концентрации 1 и 10 мкМ ингибирует каталитическую активность PARP1 (рис. 2Е, дорожки 6, 7), не влияя на образование комплексов ДНК с PARP1 (рис. 2Е, дорожки 3, 4). Это указывает на то, что олапариб является ингибитором PARP1 II типа.

В случае PARP2 олапариб при концентрации 1 и 20 мкМ усиливает образование комплексов фермента с ДНК, на что указывает уменьшение интенсивности полосы свободной ДНК и появление дополнительной полосы комплексов с низкой подвижностью в геле (рис. 2Ж, дорожки 3, 4). После добавления НАД^+ к комплексам ДНК–PARP2 в присутствии олапариба полоса комплексов с низкой подвижностью в геле исчезает, а интенсивность полосы свободной ДНК усиливается, свидетельствуя о диссоциации части комплексов вследствие авто-поли(АДФ-рибозил)ирования PARP2. Это согласуется с данными о том, что олапариб является более слабым ингибитором

PARP2, чем талазопариб [15, 20, 21, 34]. Таким образом, по данным гель-электрофореза олапариб относится к ингибиторам PARP2 I типа.

Велипариб при концентрациях 1 и 5 мкМ не оказывает заметного влияния на ДНК-связывающую активность PARP1 (рис. 23, дорожки 3 и 4). В концентрации 1 мкМ велипариб не препятствует высвобождению ДНК из комплексов с ферментом в результате НАД^+ -зависимой реакции автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP1 (рис. 23, дорожка 6), но в концентрации 5 мкМ он немного затрудняет этот процесс (рис. 23, дорожка 7), что согласуется с ранее полученными данными о том, что велипариб является более слабым ингибитором PARP1, чем талазопариб [33, 35]. Таким образом, велипариб может быть отнесен к ингибиторам PARP1 II типа.

Велипариб в концентрации 1 мкМ не оказывает значительного влияния на связывание PARP2 с ДНК, однако в концентрации 15 мкМ он заметно снижает образование комплексов ДНК–PARP2 (рис. 2И, дорожки 3, 4). Добавление НАД^+ к комплексам ДНК–PARP2 в присутствии 15 мкМ велипариба не приводит к полному высвобождению ДНК из комплексов с ферментом (рис. 2И, дорожка 6). С учетом данных гель-электрофореза велипариб следует классифицировать как ингибитор PARP2 III типа.

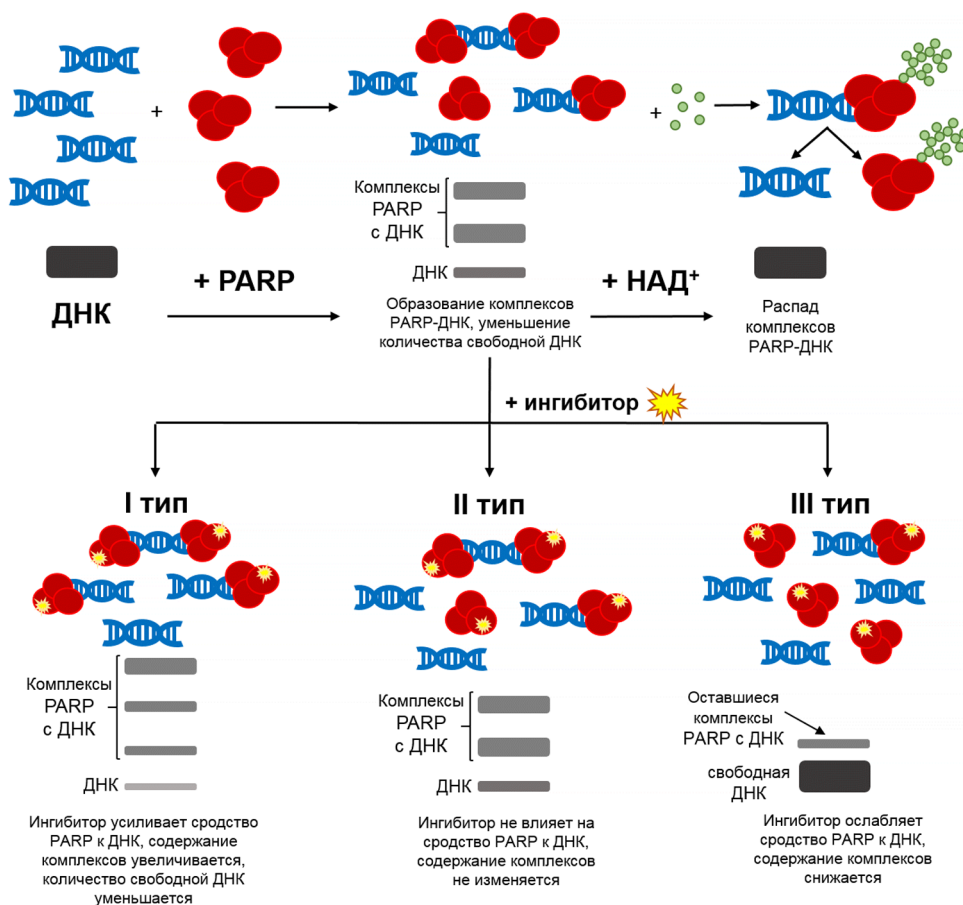


Рис. 3. Классификация ингибиторов PARP1/2 с использованием метода гель-электрофоретического анализа комплексов белок–ДНК.

Результаты исследований с применением метода гель-электрофореза талазопариба и олапариба согласуются с результатами, полученными методами поляризации флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса [13, 14]: для PARP1 данные соединения являются ингибиторами II типа, а для PARP2 – ингибиторами I типа.

Полученные нами данные методом гель-электрофореза подтверждают выводы другого исследования, в котором велипариб был отнесен к ингибиторам PARP2 III типа [14]. В тоже время исследования методом гель-электрофореза не позволяют отнести велипариб к ингибиторам PARP1 III типа, т.к. влияния велипариба на ДНК-связывающую активность PARP1 не было обнаружено. Таким образом, в настоящей работе было продемонстрировано, что для классификации ингибиторов PARP1 и PARP2 может быть использован метод гель-электрофореза, в котором в качестве субстрата и активатора фермента выступает двухцепочечный олигонуклеотид (рис. 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018;53:187–198.
2. Szanto M., Yelamos J., Bai P. Specific and shared biological functions of PARP2 – is PARP2 really a lil' brother of PARP1? *Expert. Rev. Mol. Med.* 2024;3(26)e13.
3. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Ilina E.S., Lavrik O.I. Impact of PARP1, PARP2 & PARP3 on the base excision repair of nucleosomal DNA. *Mechanisms of genome protection and repair. Advances in experimental medicine and biology, vol 1241*. Ed. D. Zharkov. Cham Springer, 2020:47–57.
4. Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):3811–3827.
5. Cohen M.S., Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nat. Chem. Biol.* 2018;14(3):236–243.
6. Maluchenko N.V., Koshkina D.O., Feofanov A.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Poly(ADP-ribosyl) code functions. *Acta Naturae.* 2021;13(2):58–69.
7. Pan L., Penney J., Tsai L.H. Chromatin regulation of DNA damage repair and genome integrity in the central nervous system. *J. Mol. Biol.* 2014;426(20):3376–3388.
8. Ko H.L., Ren E.C. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules.* 2012;2(4):524–548.
9. Das B., Choudhury B., Kumar A., Jyoti Baruah V. Genomic instability and DNA repair in cancer. *DNA: Damages and repair mechanisms*. Ed. P. Behzadi. IntechOpen; 2021:189–202.
10. Pazzaglia S., Pioli C. Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: Pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. *Cells.* 2019;9(1):41.
11. Frederick M.I., Abdesselam D., Clouvel A., Croteau L., Hassan S. Leveraging PARP-1/2 to target distant metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(16):9032.
12. Spiegel J.O., Van Houten B., Durrant J.D. PARP1: structural insights and pharmacological targets for inhibition. *DNA Repair (Amst.)*. 2021;103:103125.
13. Zandarashvili L., Langelier M.F., Velagapudi U.K., Hancock M.A., Steffen J.D., Billur R., Hannan Z.M., Wicks A.J., Krastev D.B., Pettitt S.J., Lord C.J., Talele T.T., Pascal J.M., Black B.E. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. *Science.* 2020;368(6486):eaax6367.
14. Langelier M.F., Lin X., Zha S., Pascal J.M.. Clinical PARP inhibitors allosterically induce PARP2 retention on DNA. *Sci. Adv.* 2023;9(12):eadf7175.8.
15. Rudolph J., Jung K., Luger K. Inhibitors of PARP: number crunching and structure gazing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022;119(11):e2121979119.
16. Malyuchenko N.V., Kotova E.Y., Kulaeva O.I., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae.* 2015;7(3):27–37.
17. Velagapudi U.K., Langelier M.F., Delgado-Martin C., Diolaiti M.E., Bakker S., Ashworth A., Patel B.A., Shao X., Pascal J.M., Talele T.T. Design and synthesis of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: impact of adenosine pocket-binding motif appendage to the 3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide on potency and selectivity. *J. Med. Chem.* 2019;62(11):5330–5357.
18. Kaufman B., Shapira-Frommer R., Schmutzler R.K., Audeh M.W., Friedlander M., Balmaña J., Mitchell G., Fried G., Stemmer S.M., Hubert A., Rosengarten O., Steiner M., Loman N., Bowen K., Fielding A., Domchek S.M. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.* 2015;33(3):244–250.
19. Harvey-Jones E., Raghunandan M., Robbez-Masson L., et al. Longitudinal profiling identifies co-occurring BRCA1/2 reversions, TP53BP1, RIF1 and PAXIP1 mutations in PARP inhibitor-resistant advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* 2024;35(4):364–380.

Заключение

Метод гель-электрофореза в нативных условиях расширяет ограниченный набор методов, которые применимы для исследования механизмов действия ингибиторов ферментов PARP1 и PARP2, позволяя определить влияние ингибиторов на сродство ферментов с ДНК и на их каталитическую активность.

Работа поддержана в рамках Междисциплинарных научно-образовательных школ Московского государственного университета (проект № 23-Ш04-57; исследование ингибиторов методом гель-электрофореза), а также Российским научным фондом (проект № 19-74-30003; экспрессия и очистка белков PARP1 и PARP2).

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

20. Murthy P., Muggia F. PARP inhibitors: clinical development, emerging differences, and the current therapeutic issues. *Cancer Drug Resist.* 2019;2(3):665–679.
21. Bruin M.A.C., Sonke G.S., Beijnen J.H., Huitema A.D.R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PARP inhibitors in oncology. *Clin. Pharmacokinet.* 2022;61(12):1649–1675.
22. Loehr A., Hussain A., Patnaik A., Bryce A.H., et al. Emergence of BRCA reversion mutations in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer after treatment with rucaparib. *Eur. Urol.* 2023;83(3):200–209.
23. Maluchenko N., Koshkina D., Korovina A., Studitsky V., Feofanov A. Interactions of PARP1 inhibitors with PARP1-nucleosome complexes. *Cells.* 2022;11(21):3343.
24. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ame J.C., Iliina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie.* 2013;95(6):1208–1215.
25. Deeksha W., Abhishek S., Giri J., Rajakumara E. Regulation of PARP1 and its apoptotic variant activity by single-stranded DNA. *FEBS J.* 2023; 290(18):4533–4542.
26. Laspatha N., Kaur P., Mersaoui S.Y., Muoio D., Liu Z.S., Bannister M.H., Nguyen H.D., Curry C., Pascal J.M., Poirier G.G., Wang H., Masson J.Y., Fouquerel E. PARP1 associates with R-loops to promote their resolution and genome stability. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(5):2215–2237.
27. Andreeva T.V., Maluchenko N.V., Efremenko A.V., Lyubitelev A.V., Korovina A.N., Afonin D.A., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Epigallocatechin gallate affects the structure of chromatosomes, nucleosomes and their complexes with PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(18):14187.
28. Langelier M.F., Steffen J.D., Riccio A.A., McCauley M., Pascal J.M. Purification of DNA damage-dependent PARPs from *E. coli* for structural and biochemical analysis. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase. Methods in Molecular Biology*, vol 1608. Ed. A. Tulin. N.Y.: Humana Press, 2017: 431–444.
29. Maluchenko N., Saulina A., Geraskina O., Kotova E., Korovina A., Feofanov A., Studitsky V. Zinc-dependent nucleosome reorganization by PARP2. *bioRxiv.* 2023.
30. Maluchenko N.V., Nilov D.K., Pushkarev S.V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(22):12127.
31. Chappidi N., Quail T., Doll S., Vogel L.T., Aleksandrov R., Felekyan S., Kuhnemuth R., Stoynov S., Seidel C.A.M., Bragues J., Jahnel M., Franzmann T.M., Alberti S. PARP1-DNA co-condensation drives DNA repair site assembly to prevent disjunction of broken DNA ends. *Cell.* 2024;187(4):945–961.e18.
32. Vasil'eva I., Moor N., Anarbaev R., Kutuzov M., Lavrik O. Functional roles of PARP2 in assembling protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):4679.
33. Murai J., Huang S.Y., Das B.B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J.H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* 2012;72(21):5588–5599.
34. Murai J. Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 2017;22:619–628.
35. Murai J., Huang S.Y., Renaud A., Zhang Y., Ji J., Takeda S., Morris J., Teicher B., Doroshow J.H., Pommier Y. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol. Cancer Ther.* 2014;13(2):433–443.

Поступила в редакцию 31.08.2024

После доработки 28.10.2024

Принята в печать 29.10.2024

RESEARCH ARTICLE

Gel electrophoretic analysis of protein-DNA complexes to classify inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2

A.A. Lobanova^{1,*}, A.N. Korovina¹, D.O. Koshkina¹, P.A. Chernikova¹, A.V. Feofanov¹ ,
V.M. Studitsky^{1,2} , D.K. Nilov³ , N.V. Maluchenko¹ 

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Lenin Hills 1, bldg. 12, Moscow, 119234, Russia;

²Fox Chase Cancer Research Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, Philadelphia 19111-2497, USA;

³Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
Lenin Hills 1, bldg. 40, 119992, Moscow, Russia.

*e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 (PARP1 and PARP2) play an important role in repairing DNA, and their inhibition is being used to treat certain oncological diseases. New inhibitors of PARP are being actively developed and the mechanisms of their action are being studied. In the present work, using the inhibitors talazoparib, olaparib and veliparib, as example, it is shown that electrophoresis of DNA complexes with PARP1 and PARP2 in polyacrylamide gel in the presence of inhibitors makes it possible to identify the effect of inhibitors on the affinity of

enzymes to DNA, and after adding the NAD⁺ substrate, to evaluate the inhibition of the catalytic activity of enzymes. When selecting new inhibitors for biomedical research, it is important to consider these mechanisms of action against PARP1 and PARP2.

Keywords: *PARP, inhibitors, electrophoresis, talazoparib, olaparib, veliparib*

Funding: The study was supported by the scientific project of Lomonosov Moscow State University research and education schools (project No. 23-Sh04-57; study of inhibitors by gel electrophoresis) and by the Russian Science Foundation (project No. 19-74-30003; expression and purification of PARP1 and PARP2 proteins).

Сведения об авторах

Лобанова Ангелина Андреевна — инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, магистр 1 года кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Коровина Анна Николаевна — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna.korovina@gmail.com

Кошкина Дарья Олеговна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495 939-57-38; e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru

Черникова Полина Андреевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495 939-57-38; e-mail: xirom210197@gmail.com

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

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и отдела эпигенетики рака ракового центра Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

Нилов Дмитрий Константинович — вед. науч. сотр. отдела биокинетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-53-59; e-mail: nilovdm@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5067-7939>

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-57-38, e-mail: mal_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК: 581.55

Функциональные признаки растений и разнообразие субальпийских пестрокостровых лугов Северо-Западного Кавказа**С.Д. Варыбок¹, В.Г. Онипченко^{1, 2, 3, *} , Д.М. Гулов⁴ , Т.Г. Елумеева¹** ¹*Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Карачаево-Черкесский университет имени У.Д. Алиева, Россия, 36920, г. Карачаевск, Карачаево-Черкесская Республика, ул. Ленина, д. 29;*³*Тебердинский национальный парк, Россия, 369210, Карачаево-Черкесская Республика, г. Теберда, пер. Бадукский, д. 1;*⁴*Институт биологии, Российская академия наук, Россия, 450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, пр. Октября, д. 69*
**e-mail: vonipchenko@mail.ru*

На примере субальпийских пестрокостровых лугов (ПКЛ) Северо-Западного Кавказа оценена роль функциональных признаков листа (площади, массы, удельной листовой поверхности, содержания воды) и высоты растений, а также эколого-ценотических CSR-стратегий Ф. Грайма для формирования состава сообщества и доминирования в нем растений. ПКЛ развиваются в условиях бесснежной зимы и глубокого промерзания почв, служат уникальными пастбищами для высокогорных копытных. В работе проверена гипотеза, согласно которой значения функциональных признаков и стратегий растений на ПКЛ отличны от полученных ранее значений для других высокогорных фитоценозов Кавказа в сторону большей выраженности стресс-толерантности (S) и рудеральности (R). Запасы надземной биомассы составляют 349 ± 15 г/м². Все изученные признаки важны для отбора в состав сообщества: показатели размерных характеристик листа на ПКЛ в 10 раз ниже, чем в модельном фитоценозе. Доминированию в сообществе способствуют более мелкие сухие и жесткие листья при большей функциональной высоте особи. Средние значения вклада C:S:R-стратегий составили 26:45:29%. Высокий вклад стресс-толерантной стратегии важен как для отбора видов в сообщество, так и для доминирования в нем. Высокое функциональное богатство зафиксировано по признаку содержания воды в листе, функциональная дивергенция высока только по размерным признакам листа.

Ключевые слова: функциональные признаки, эколого-ценотические стратегии, функциональное разнообразие, субальпийские луга, надземная биомасса, удельная листовая поверхность

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-16

Введение

Одна из центральных задач современной экологии — выявление зависимости механизмов изменения состава и структуры сообществ от их функционального разнообразия [1], оценка которого базируется на анализе функциональных признаков растений [2]. Исследования в рамках функционального подхода позволят лучше предсказывать динамику фитоценозов в ответ на антропогенное влияние [3], в том числе — на глобальное изменение климата [4].

Чаще всего в качестве функциональных признаков выступают признаки листа — например, размерные характеристики: площадь (LA, leaf area) и масса, удельная листовая поверхность

(УЛП). Они изменчивы в широких пределах в зависимости от условий среды [5], а также позволяют оценить эффективность поглощения и использования ресурсов организмом [6]. Высота растения также — один из самых репрезентативных признаков [7], она играет важную роль в исходе конкуренции [8]. Комбинации признаков характеризуют экологические CSR стратегии видов Раменского-Грайма: C — competitor, «конкурент», S — stress-tolerant, «стресс-толерант» и R — ruderal, «рудерал» [9]. Их вклад возможно количественно оценить на основании функциональных признаков листьев [10].

В процессе описания функционального разнообразия рассчитывают средние, средневзвешен-

ные по участию (community weighted mean, CWM) и случайные средние значения. Последние — на основе предположения о том, что вид мог бы обладать любым значением признака, встречающимся у видов региональной флоры. Сравнение среднего со случайным выявляет, важен ли признак для вхождения в состав сообщества. Сравнение средних с CWM показывает, важен ли признак для доминирования вида в фитоценозе. Индексы функционального разнообразия: функциональное богатство (functional richness, FRic), выравненность (functional evenness, FEve), дивергенция (functional divergence, FDiv) связаны с характером распределения значений признаков в фитоценозе [11, 12]. Они позволяют оценить относительное влияние среды на состав сообщества. Значительное влияние абиотических факторов приводит к конвергенции, схождению признаков, низким FDiv и FRic. Влияние биотических факторов приводит к локальному увеличению внутривидовой изменчивости и дивергенции, расхождению признаков особей, высокому FDiv [13].

Удобный объект для исследования функционального разнообразия — высокогорные сообщества. Они мало нарушены человеком, имеют богатый флористический состав и сомкнутую структуру, благодаря чему неоднородные условия среды обеспечивают высокую контрастность фитоценозов [12, 14]. Однако функциональная структура данных сообществ относительно мало исследована [15]. Ранее в фитоценозах альпийского пояса Кавказа были измерены функциональные признаки и оценены CSR-стратегии [15, 16]. Наравне с преобладанием видов S-стратегии, в некоторых сообществах высок средний вклад как C-, так и R-стратегий. Показано, что функциональные признаки листьев важны как для возможности произрастания видов в составе альпийских сообществ, так и для доминирования в них [16]. Подобные работы в субальпийском поясе единичны. Отмечено, что наравне с S-стратегией в некоторых сообществах высок вклад C-стратегии [8]. Пестрокостровые луга (ПКЛ) развиваются по наветренным платообразным возвышенностям и крутым склонам южной экспозиции в уникальных для субальпийского пояса условиях: они не покрыты снегом в зимнее время, вследствие чего из-за глубокого промерзания почвы снижена микробиологическая активность и растения испытывают недостаток элементов минерального питания (ЭМП). Также ПКЛ служат основными осенне-зимними и весенними пастбищами для туров, серн и оленей. Поедание фитомассы высокогорными копытными повышает интенсивность круговорота на ПКЛ, а оставленные продукты жизнедеятельности — продуктивность. В связи с этим мы рассматриваем гипотезу доминирования на ПКЛ видов стресс-толерантов наряду с относительно большим участием рудералов. Цель

настоящей работы — проверка этой гипотезы и оценка роли функциональных признаков листьев и высоты в формировании структуры субальпийских ПКЛ, изучение параметров их функционального разнообразия. Для достижения цели поставлены задачи: 1) изучить состав надземной биомассы ПКЛ; 2) оценить роль CSR-стратегий и функциональных признаков листьев, а также высоты растений для формирования состава и доминирования видов на ПКЛ; 3) рассчитать показатели функционального разнообразия для оценки влияния биотических и абиотических факторов на структуру ПКЛ.

Материалы и методы

Материал для исследования надземной фитомассы собрали методом укосов на Северо-Западном Кавказе в 2021 и 2022 гг. с июля по август на территории Тебердинского национального парка в окрестностях г. Малая Хатипара. Вдоль трансект на высоте 2300–2600 м над уровнем моря преимущественно в сообществах с преобладанием в структуре *Bromus variegatus* на случайных расстояниях заложили 100 пробных площадок 25 × 25 см. С них срезали надземную биомассу, собрали мортмассу, мхи и эпигейные лишайники и в свежем состоянии разобрали на соответствующие фракции, надземную биомассу — по видам сосудистых растений (определение видов произвели в камеральных условиях). Номенклатура в работе дана согласно В.Г. Онипченко и А.С. Зернову [17]. Пожелтевшие листья прибавили к биомассе соответствующего вида.

После разбора образцы поместили в бумажные пакеты и сушили пробы до постоянной массы (8–36 ч при 80°C). Затем взвесили на технических весах (точность до 0,1 г), более мелкие образцы — на полуаналитических весах (точность до 0,0001 г). Все значения пересчитали на один м². Рассчитали надземную фитомассу как сумму мортмассы, биомассы сосудистых растений, массы мхов и лишайников. На основе данных о составе биомассы рассмотрели ранговое распределение видов в сообществе по биомассе.

Функциональные признаки измерили согласно международному протоколу [18]. Для каждого вида собрали не менее 10 хорошо развитых и неповрежденных листьев. Их в водонасыщенном состоянии взвесили и отсканировали для определения LA, а после высушили при температуре 80°C не менее 6 ч до постоянной массы и вновь взвесили. УЛП (в см²/г) рассчитали как отношение LA к сухой массе листа. Высоту измерили 25 раз для каждого вида как кратчайшее расстояние от верхних хорошо развитых листьев до субстрата. Детально методика измерений изложена ранее [8]. Для вычисления степени выраженности CSR-стратегий для каждого вида использовали калькулятор StrateFy [10].

Рассчитали средние и средневзвешенные (по надземной биомассе видов) признаки и стратегии на 100 площадках сообщества. В среде R-Studio 4.3.1 (R Core Team, 2021) также рассчитали случайные средние: имея данные с показателями для 443 вида высокогорной флоры Тебердинского национального парка, мы случайным образом выбрали из них значения для каждой площадки в соответствии с числом видов на ней и находили среднее. Возможность повторного выбора значения признака или стратегии была исключена. Случайный выбор для всех 100 площадок провели 100 раз. Затем сравнили все 100 выборок случайных значений со средними с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для сопряженных пар. Его же использовали при сравнении средних и средневзвешенных, распределение которых также часто отличалось от нормального.

По всем площадкам и для каждого функционального признака в R-Studio 4.3.1 вычислили три показателя функционального разнообразия. Для расчета FRic, FEve использовали функцию 'dbFD' из пакета 'FD' [19]. FDiv рассчитали непосредственно по формуле [11].

Для полученных случайных значений признаков по 100 площадкам также вычислили FRic, FEve, FDiv. Структуру сообществ по биомассе на

каждой площадке оставили неизменной. Затем сравнили полученные для модели 100 значений каждого индекса по всем признакам с наблюдаемым распределением показателей на ПКЛ с помощью критерия Вилкоксона.

Результаты

Надземная биомасса составила 349 ± 15 г/м² (среднее и его ошибка, $n=100$, здесь и далее), мортмасса – 293 ± 17 г/м², общая надземная фитомасса – 664 ± 26 г/м², масса эпигейных лишайников – $1,6 \pm 0,7$ г/м² и мхов – $22,2 \pm 4,44$ г/м². В составе фитомассы сосудистые растения составляли $54,2 \pm 1,5\%$, мортмасса – $42,9 \pm 1,4\%$, мхи – $2,9 \pm 0,6\%$. Наибольшую долю мхов составил *Rhytidium rugosum*. Номенклатура дана согласно Е.А. Игнатовой и др. [20]. Печеночники не были встречены. ПКЛ принадлежат к злаково-разнотравным лугам. Разнотравье образует около $42,2 \pm 2,0\%$ надземной биомассы, злаки – $27,4 \pm 2,1\%$, осоки и ситники – $22,0 \pm 1,8\%$, бобовые – $7,2 \pm 1,0\%$, древесные – $1,2 \pm 0,6\%$.

Число видов сосудистых растений, отмеченных на укусных площадках, варьировало от 7 до 21, в среднем $11,7 \pm 0,3$. Максимальная биомасса наблюдается при большем, нежели среднее, числе видов. На ПКЛ отмечены 6 доминантов (видов,

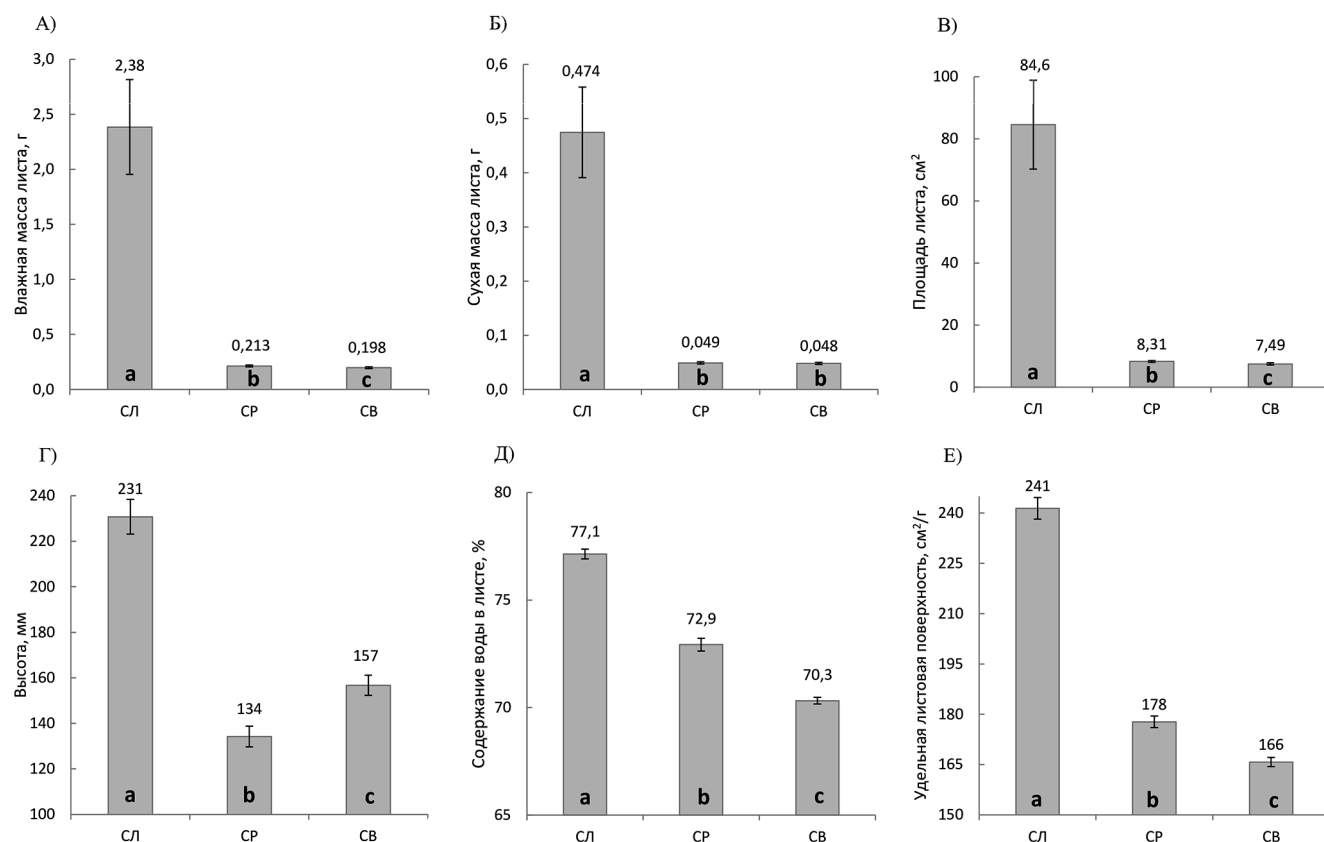


Рис. 1. Сравнение случайных (СЛ), средних (СР) и средневзвешенных (СВ) значений шести функциональных признаков: А – влажной массы листа, Б – сухой массы листа, В – площади листа, Г – высоты, Д – содержания воды в листе, Е – удельной листовой поверхности. Непересекающиеся буквы **a, b, c** показывают отличия по тесту Вилкоксона на уровне значимости $p < 0,05$, $n = 100$. Значения, не отличающиеся по тесту, отмечены одинаковыми буквами. Вертикальный отрезок (усы) показывает ошибку среднего.

образующих более 5% надземной массы – согласно Т.А. Работнову [21]): *Carex humilis* (15,9%), *Bromus variegatus* (15,6%), *Plantago atrata* (8,9%), *Scabiosa caucasica* (8,7%), *Calamagrostis arundinacea* (5,7%), *Festuca ovina* (5,2%) и 38 редких видов, чей вклад в биомассу составил < 0,1% (для отдельных видов). У видов наблюдается схожесть значений биомассы, при этом в ранговом распределении изменение показателей неравномерно, а ступенчато, особенно у доминантов, распределенных попарно.

Средние значения размерных характеристик листа, УЛП, содержания воды в листе, высоты растений на ПКЛ ниже, чем случайные средние (рис. 1). При этом для размерных характеристик показатели различаются в 10 раз.

На ПКЛ преобладают стресс-толеранты со средним вкладом $45,5 \pm 0,6\%$. Высокий вклад данной стратегии важен как для отбора в сообщество, так и для доминирования в нем (рис. 2). При этом в ПКЛ отбираются виды с меньшим вкладом конкурентной и рудеральной стратегий, а доминируют виды с меньшим вкладом R-стратегии.

Получены наблюдаемые и случайные индексы функционального разнообразия для шести признаков (таблица). Высокое богатство зафиксировано лишь по признаку содержания воды в листе (0,71): виды по-разному реагируют на водный стресс, на площадках сосуществуют суккуленты и ксерофиты. Богатство по признакам высоты (0,12), сухой массы листа (0,17) и УЛП (0,38) ниже случайной величины, тогда как влажной массы (0,23) и площади листа (0,18) – выше. Дивергенция высока только по размерным признакам листа (0,76–0,83). Судя по низкой дивергенции оставшихся признаков, на площадках сосуществуют виды с мягкими крупными листьями и мелкими жесткими, обводненными и сухими, виды разной высоты. FDiv по всем рассмотренным признакам на ПКЛ выше, чем на модельном лугу, за исключением содержания воды в листе (0,07). Функциональная выравненность всех признаков оказалась сходной (от 0,391 до 0,466), FEve принимает средние значения. При этом на ПКЛ по сравнению с модельным сообществом наблюдается большая выравненность по всем признакам (таблица).

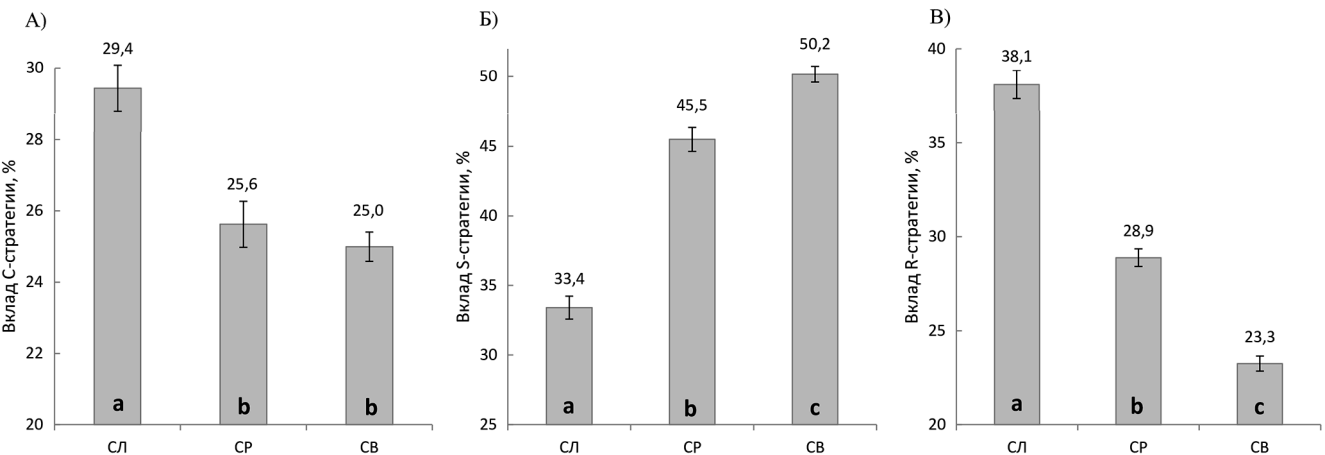


Рис. 2. Сравнение случайных (СЛ), средних (СР) и средневзвешенных (СВ) значений: А – вклада С-стратегии, Б – вклада S-стратегии, В – вклада R-стратегии. Непересекающиеся буквы **a, b, c** показывают отличия по тесту Вилкоксона на уровне значимости $p < 0,05$, $n = 100$. Значения, не отличающиеся по тесту, отмечены одинаковыми буквами. Вертикальный отрезок (усы) показывает ошибку среднего.

Таблица

Сравнение индексов функционального разнообразия в модельном сообществе (случ.) и на пестрокопцовых лугах (набл.) по шести функциональным признакам

Индекс Показатель	FRic наблюдаемый	FRic случайный	FEve наблюдаемый	FEve случайный	FDiv наблюдаемый	FDiv случайный
Высота	0,12±0,01	0,23±0,01	0,45±0,02	0,42±0,02	0,62±0,02	0,73±0,01
Влажная масса листа	0,23±0,01	0,05±0,02	0,39±0,02	0,33±0,01	0,83±0,01	0,94±0,00
Сухая масса листа	0,17±0,01	0,21±0,04	0,42±0,02	0,26±0,01	0,79±0,01	0,97±0,00
Площадь листа	0,18±0,01	0,06±0,01	0,40±0,02	0,24±0,01	0,76±0,02	0,96±0,00
Содержание воды в листе	0,71±0,01	0,73±0,02	0,47± 0,01	0,41±0,01	0,07±0,00	0,05±0,00
УЛП	0,38±0,01	0,59±0,01	0,44±0,02	0,37±0,01	0,28±0,01	0,42±0,01

Примечания: Полужирным шрифтом отмечены различающиеся по критерию Вилкоксона индексы FRic – функционального богатства, FEve – функциональной выравненности и FDiv – функциональной дивергенции на уровне значимости $p < 0,05$, $n = 100$. УЛП – удельная листовая поверхность.

Обсуждение

Впервые исследована структура надземной фитомассы ПКЛ. Значение надземной биомассы оказалось схожим с таковым для альпийских гераниево-копеечниковых и пестроовсяницевых лугов [14]. На вейниковых лугах [22] и в высокотравье (здесь и далее согласно Д.М. Гулову и др. [23]) Северо-Западного Кавказа биомасса выше. Это ожидаемо, поскольку продукция растений часто уменьшается в бесснежных сообществах [14]. Более низкие значения отмечены на субальпийских болотах [24], а также на альпийских лишайниковых пустошах и коврах [14]. Для большинства высокогорных сообществ надземная биомасса колеблется от 100 до 600 г/м² и в среднем составляет 200 г/м² [12]. Относительно высокое значение биомассы на ПКЛ вероятно связано с деятельностью копытных, за счет экскрементов которых повышается богатство почв и продуктивность сообществ.

Мортмасса ПКЛ оказалась в среднем ниже, чем на вейниковых лугах, но сравнимой с показателем высокотравья и выше, чем для болот. В альпийских сообществах лишь на пестроовсяницевых лугах мортмасса гораздо выше. Небольшие запасы на ПКЛ связаны с их использованием в качестве зимних пастбищ, а в высокотравье — интенсивным биологическим круговоротом [23].

Массы мхов и эпигейных лишайников на ПКЛ превышают показатели субальпийских фитоценозов, исключение составляют болота. В альпийских сообществах масса мохообразных существенно ниже, чем на ПКЛ, тогда как представленность эпигейных лишайников, наоборот, выше [14]. На вейниковых лугах и в высокотравье высокое проективное покрытие сосудистых растений, лишайники вовсе не встречаются. Наличие мхов определяется как наличием открытых участков [14], так и доступностью воды, ЭМП [25]. В аналогичных ПКЛ местообитаниях в альпийском поясе располагаются лишайниковые пустоши, где свободные от сосудистых растений надземные участки заняты лишайниками. На ПКЛ более благоприятные значения температуры и влажности, и в прогалинах лишайники вытесняются мхами, имеющими более высокую скорость роста: их продукция ежегодно составляет около 30% от биомассы.

Анализ видового состава надземной биомассы сосудистых растений выявил шесть доминантных видов. Существует предположение, что направления изменения признаков у доминирующих и недоминирующих видов могут быть противоположными в связи изменением среды доминантами [26]. Если считать доминирование показателем приспособленности [13], то в нашем случае «пара» граминоидов с наибольшей биомассой — наиболее приспособленная к абиотическим факторам группа, поэтому отвечает общей закономерности «повышения стресс-толерантности». Вторая же пара разнотравных видов про-

тивоположно отвечает на окружающую среду, уже преобразованную доминантами [26].

При сравнении средних и случайных значений функциональных признаков выявлено, что отбор идет в пользу особей с более мелкими, жесткими листьями с низким содержанием воды. В результате сравнения средних со средневзвешенными показано, что доминированию в сообществе способствуют более мелкие сухие и жесткие листья при большей высоте особи.

Средневзвешенные размерные характеристики листа на ПКЛ были ниже, чем в других субальпийских сообществах Тебердинского национального парка: в 1,5–2 раза ниже, чем на вейниковых лугах [22] и болотах, и более чем в 30 раз ниже, чем в высокотравье [27]. Эти же показатели были выше на ПКЛ в 1,5–2 раза по сравнению с альпийскими фитоценозами, за исключением гераниево-копеечниковых лугов [15]. С увеличением площади листа возрастает конкурентоспособность [28]. Аналогично в сообществах с большей, чем на ПКЛ, средней площадью листа, в среднем выше вклад видов конкурентной стратегии.

Средневзвешенная УЛП на ПКЛ ниже, чем в высокотравье и болотах [27], но значительно выше, чем на вейниковых лугах. Она же выше, чем на пестроовсяницевых лугах и на альпийских пустошах, но несколько ниже, чем на коврах, сложенных преимущественно видами разнотравья [15]. Средняя УЛП на ПКЛ ниже, чем в альпийских сообществах в Давосе (190 см²/г) [12]. Снижение средней УЛП в порядке «высокотравье > вейниковые луга > болота > пестроостровые луга» может быть связано со снижением доступности ЭМП [29].

На ПКЛ преобладают стресс-толеранты. В пределах субальпийского пояса более высокие значения стресс-толерантности отмечены только на вейниковых лугах, на болотах — они схожи со значениями на ПКЛ. В альпийских сообществах средневзвешенный вклад S-стратегии почти во всех случаях превышал полученные значения для ПКЛ [16]. Средневзвешенный вклад R-стратегии выше в высокотравье, что, возможно, объясняется деятельностью полевков и медведей [14], и также выше на болотах и на альпийских коврах. В последнем случае — в связи с коротким вегетационным сезоном [16]. При этом средневзвешенный вклад для видов остальных фитоценозов был ниже. Относительно высокий вклад рудералов на ПКЛ может объясняться регулярным отчуждением биомассы копытными.

Высокое функциональное богатство (FRic) зафиксировано на ПКЛ лишь по признаку содержания воды в листе. В целом, растения высокогорий вынуждены адаптироваться скорее к суровым условиям местообитания, нежели к высокой конкуренции, и лишь немногие виды устойчивы к недостатку тепла или аридности, поэтому функциональное разнообразие травянистых растений

уменьшается от мезофитных сообществ к более сухим [30]. FRic на ПКЛ по признаку УЛП и высоты сильно ниже, чем случайные значения, что может быть связано со значительным влиянием абиотических факторов [13]. Также на ПКЛ по сравнению с модельным сообществом наблюдается большая выравненность по распределению всех признаков, поскольку «сборка» сообщества подчинена экологическим закономерностям. Дивергенция высока только по размерным признакам листа, она может служить показателем конкуренции. Низкая дивергенция по оставшимся функциональным признакам — УЛП, содержанию воды в листе, высоте — говорит о сосуществовании в сообществе видов с мягкими крупными листьями и мелкими жесткими, обводненными и сухими, видов разной высоты. Вероятно, на разброс почти всех признаков сильнее влияют абиотические факторы [13], большинство видов подчиняется закономерности повышения вклада стресс-толерантной стратегии, конвергируют (случайные FDiv ниже наблюдаемых). Исключение составляет признак содержания воды в листе: виды в сообществе дивергируют (случайная FDiv выше наблюдаемой), вероятно, ввиду конкуренции за воду [13].

Заключение

Надземная биомасса ПКЛ составила 349 ± 15 г/м², мортмасса — 293 ± 17 г/м², масса эпигейных лишайников — $1,6 \pm 0,7$ г/м², мхов — $22,2 \pm 4,44$ г/м² и общая надземная фитомасса — 664 ± 26 г/м². Средние

значения размерных характеристик листа, УЛП, содержания воды в листе, высоты растений на ПКЛ ниже, чем случайные средние для данного фитоценоза. Следовательно, эти показатели важны для отбора видов в состав сообщества. Средневзвешенные значения влажной массы листа, содержания воды в листе, площади листа и УЛП на ПКЛ меньше средних, а высота — больше. Это свидетельствует о важности более мелких сухих и жестких листьев при большей функциональной высоте особи для доминирования в сообществе. Преобладающей стратегией для видов ПКЛ является стресс-толерантная. Большая стресс-толерантность и меньшая конкурентность и рудеральность способствуют отбору видов на ПКЛ, а доминированию в сообществе способствует еще больший вклад S-стратегии и меньший вклад R-стратегии. Зафиксирован высокий показатель дивергенции по размерным характеристикам листа. Функциональное богатство для всех признаков было небольшим, за исключением содержания воды в листе: виды имеют разные адаптации водному стрессу, на ПКЛ встречаются как ксерофиты, так и суккуленты.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121032500089-1. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Myers-Smith I., Thomas H., Bjorkman A. Plant traits inform predictions of tundra responses to global change. *New Phytol.* 2019;221(4):1742–1748.
- Violle C., Navas M., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I., Garnier E. Let the concept of trait be functional! *Oikos*. 2007;116(305):882–892.
- Laliberte E., Legendre P. A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits. *Ecology*. 2010;91(1):299–305.
- Joswig J., Wirth C., Schuman M. et al. Climatic and soil factors explain the two-dimensional spectrum of global plant trait variation. *Nat. Ecol. Evol.* 2022;6(1):36–50.
- Wright I., Dong N., Maire V., et al. Global climatic drivers of leaf size. *Science*. 2017;357(6354):917–921.
- Onoda Y., Wright I., Evans J., Hikosaka K., Kitajima K., Niinemets Ü., Poorter H., Tosens T., Westoby M. Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economic spectrum. *New Phytol.* 2017;214(4):1447–1463.
- Moles A., Warton D., Warman L., Swenson N.G., Laffan S.W., Zanne A.E., Pitman A., Hemmings F.A., Leishman M.R. Global patterns in plant height. *J. Ecol.* 2009;97(5):923–932.
- Dudova K.V., Dzhatdоеva T.M., Dudov S.V., Akhmetzhanova A.A., Tekeev D.K., Onipchenko V.G. Competitive strategy of subalpine tall-grass species of the Northwestern Caucasus. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019;74(3):140–146.
- Grime J.P. *Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties*. 2nd ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2001. 417 pp.
- Pierce S., Negreiros D., Cerabolini B., et al. A global method for calculating plant CSR ecological strategies applied across biomes world-wide. *J. Funct. Ecol.* 2017;31(2):444–457.
- Mason N.W.H., Mouillot D., Lee J.B., Wilson W.G. Functional richness, functional evenness and functional divergence: The primary components of functional diversity. *Oikos*. 2005;111(1):112–118.
- Körner C. *Alpine plant life: Functional plant ecology of high mountain ecosystems*. 2nd ed. Berlin: Springer; 2003. 344 pp.
- Garnier E., Navas M.L., Grigulis K. *Plant functional diversity*. Oxford: Oxford Univ. Press; 2016. 249 pp.
- Onipchenko V.G. Alpine ecosystems in the Northwest Caucasus. Dordrecht, Boston, L.: Kluwer Academic Publishers; 2004. 421 pp.
- Онипченко В.Г., Дудова К.В., Гулов Д.М., Ахметжанова А.А., Текеев Д.К., Елумеева Т.Г. Функциональные признаки листьев растений важны для формирования состава альпийских растительных сообществ. *Журнал Общей Биологии*. 2022;83(2):127–137.
- Онипченко В.Г., Дудова К.В., Ахметжанова А.А., Хомутовский М. И., Джатдоева Т.М., Текеев Д.К., Елу-

меева Т.Г. Какие стратегии растений способствуют их доминированию в альпийских сообществах? *Журнал Общей Биологии*. 2020; 81(1):37–46.

17. Онипченко В.Г., Зернов А.С. *Сосудистые растения Тебердинского национального парка, вып. 99Б*. М.: Флора и фауна заповедников. 2022. 177 с.

18. Pérez-Harguindeguy N., Díaz S., Garnier E. et al. New handbook for standardized measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* 2013;61(3):167–234.

19. Laliberté E., Legendre P., Shipley B. 2014. FD: measuring functional diversity from multiple traits, and other tools for functional ecology. R package version 1.0–12. <https://cran.r-project.org/web/packages/FD/index.htm>

20. Игнатов Е.А., Игнатов М.С., Константинова Н.А., Золотов В.И., Федосов В.Э., Онипченко В.Г. *Флора мохообразных Тебердинского национального парка, вып. 112а*. М.: Флора и фауна заповедников; 2022. 108 с.

21. Работнов Т.А. *Луговедение*. М.: Изд-во МГУ; 1974. 384 с.

22. Poloshevets T.V., Onipchenko V.G., Sandalova E.V., Dzhatdueva T.M., Elumeeva T.G. Leaf functional traits and strategies of plants in subalpine Calamagrostis meadows of the North-Western Caucasus. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2024;79(1):9–14.

23. Гулов Д.М., Онипченко В.Г., Мартыненко В.Б., Федоров Н.И., Логвиненко О.А., Узденов У.Б., Хубиева О.П. Состав надземной фитомассы субальпийского высокоотравья в Тебердинском национальном парке. *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 2022;127(5):46–53.

24. Гулов Д.М., Федоров Н.И., Логвиненко О.А., Онипченко В.Г. Состав надземной фитомассы субаль-

пийских болот в Тебердинском национальном парке. *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 2023; 128(4):27–37.

25. Sun S.Q., Wu Y.H., Wang G.X., Zhou J., Yu D., Bing H.J., Luo J., 2013. Bryophyte species richness and composition along an altitudinal gradient in Gongga Mountain, China. *PLoS One*. 2013;8(3):e58131.

26. Arnillas C., Borer E., Seabloom E. et al. Opposing community assembly patterns for dominant and nondominant plant species in herbaceous ecosystems globally. *Ecol. Evol.* 2021;11(24):17744–17761.

27. Гулов Д.М., Елумеева Т.Г., Федоров Н.И., Полощевец Т.В., Клинка Г.В., Логвиненко О.А., Джатдоева Т.М., Онипченко В.Г. Функциональные признаки листьев и экологические стратегии важны для формирования растительных сообществ субальпийских болот и высокоотравья. *Журнал Общей Биологии*. 2024;85(2):83–94.

28. Moles A.T. Being John Harper: Using evolutionary ideas to improve understanding of global patterns in plant traits. *J. Ecol.* 2018;106(1):1–18.

29. Hodgson J.G., Montserrat-Marti G., Charles M. et al. Is leaf dry matter content a better predictor of soil fertility than specific leaf area? *Ann. Bot.* 2011;108(7):1337–1345.

30. Spasojevic M.J., Grace J.B., Harrison S., Dam-schen E.I. Functional diversity supports the physiological tolerance hypothesis for plant species richness along climatic gradients. *J. Ecol.* 2014;102(2):447–455.

Поступила в редакцию 17.04.2024

После доработки 21.11.2024

Принята в печать 24.12.2024

RESEARCH ARTICLE

Functional plant traits and diversity of subalpine *Bromus variegatus* grasslands of the North-Western Caucasus

S.D. Varybok¹, V.G. Onipchenko^{1, 2, 3, *} , D.M. Gulov^{1, 4} , T.G. Elumeeva¹ 

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²U.D. Aliyev Karachay-Cherkess State University,
ul. Lenina, 29, Karachayevsk, The Karachay-Cherkess Republic, 369200, Russia;

³Teberdinsky National Park, per. Baduisky, 1, Teberda, KCR, 369210, Russia;

⁴Institute of Biology, Russian Academy of Science, October Ave., 69, Ufa, 450054, Republic of Bashkortostan, Russia

*e-mail: vonipchenko@mail.ru

The role of leaf functional traits (leaf area, mass, specific leaf area — SLA, water content), plant height and Grime's CSR strategies in plant community formation and plant dominance was studied for subalpine grasslands of the NW Caucasus. These grasslands occur on snowless slopes with deep soil freezing and serve as pastures for high-mountain ungulates. We tested the hypothesis that plant community combines features of stress-tolerants and ruderals and differs from the previously studied high-mountain communities of the Caucasus. The mean aboveground biomass is 349 ± 15 g/m². Comparison of the mean species trait values with a random sample of a local flora revealed the importance of all studied traits for species selection into community, for instance, leaf size characteristics in grasslands are 10 times lower than in the model community. Comparison of mean and weighted mean shows that dominants of community have smaller dry and stiff leaves at higher functional height of the individual. The

mean values of the C:S:R contribution were 26:45:29%. The high contribution of S-strategy is important for both species selection into grasslands and dominance in them. High richness (FR) was recorded for the leaf water content. Divergence (FD) was high only for leaf size traits.

Keywords: *functional traits, ecological strategies, functional diversity, subalpine grasslands, aboveground biomass, specific leaf area*

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University № 121032500089-1.

Сведения об авторах

Варыбок Софья Дмитриевна — магистрант кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-64; e-mail: svarybok@mail.ru

Онипченко Владимир Гертрудович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-64; e-mail: vonipchenko@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1626-1171>

Гулов Давут Меретгелдиевич — мл. науч. сотр. кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ, аспирант Уфимского института биологии УФИЦ РАН. Тел.: 8-347-235-62-47; e-mail: davut.gulov.96@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4888-3223>

Елумеева Татьяна Георгиевна — канд. биол. наук, доц. кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-31-65; e-mail: elumeeva@yandex.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0589-830X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.113.6:546.824-31+578.282:578.825.1

Эффективное ингибирование репликации вируса простого герпеса 1-го типа *in vitro* с помощью олигонуклеотид-содержащих нанокompозитов

М.Н. Репкова¹ , В.Ф. Зарытова¹ , О.Ю. Мазурков² , Н.А. Мазуркова² ,
Е.В. Макаревич² , Е.И. Филиппова² , М.Д. Некрасов¹ ,
М.С. Купрюшкин¹ , А.С. Левина^{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: asl1032@yandex.ru

Борьба с герпесвирусными инфекциями является насущной проблемой общественно-го здравоохранения из-за широкой распространенности вируса простого герпеса, который вызывает целый ряд заболеваний, начиная от легких первичных поражений кожи и заканчивая тяжелым, а иногда и смертельным энцефалитом. Использование антисмысловых олигонуклеотидов (ON, oligonucleotide) для подавления репликации вируса простого герпеса является многообещающим направлением в этой области. Для доставки ON в клетки мы создали нанокompозиты, состоящие из антисмысловых ON, иммобилизованных на наночастицах TiO₂ в форме анатаза (Ans~ON). Мы исследовали противовирусную активность нескольких нанокompозитов, содержащих ON, нацеленные на различные участки генома вируса простого герпеса 1. В работе использовались немодифицированные ON и ON с метилсульфонилфосфорамидными межнуклеотидными группами. Наиболее эффективные нанокompозиты снижали репликацию вируса в культуре клеток на 3–3,5 порядка. Значения индекса селективности этих нанокompозитов были оценены как 90–110 в лечебном режиме.

Ключевые слова: нанокompозиты, антисмысловые олигонуклеотиды, TiO₂-наночастицы (анатаз), противовирусный эффект, вирус простого герпеса

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-14

Сокращения

Ans — наночастицы TiO₂ в кристаллической форме анатаз (от англ. anatase);

IC₅₀ — 50%-я эффективная концентрация образца, приводящая к ингибированию вируса на 50%;

MOI — среднее количество вирусных частиц на одну клетку (multiplicity of infection);

ON — олигонуклеотид (oligonucleotide);

PL — полилизин (polylysine);

ТС₅₀ — 50%-я токсическая концентрация образца, приводящая к гибели 50% неинфицированных клеток;

ВПГ-1 — вирус простого герпеса первого типа; ДМСИ — модифицированная Дульбекко среда Игла;

НК — нуклеиновая кислота;

ТЦД — тканевая цитопатическая доза;

ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка.

Введение

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает целый ряд заболеваний, начиная от легких первичных поражений кожи, слизистых оболочек и эпителия роговицы и заканчивая тяжелыми, а иногда и смертельными эпизодами энцефалита. Широко используемые в настоящее время противогерпетические аналоги нуклеозидов (в первую очередь, ацикловир) имеют ряд недостатков: низкую растворимость в воде, высокую клеточную токсичность и резистентность к ним вновь появляющихся вирусных изолятов. Поэтому существует необходимость в поиске новых способов лечения герпесвирусных инфекций. Антисмысловые олигонуклеотиды (ON, oligonucleotide) потенциально могут быть использованы для подавления экспрессии мРНК генов, ответственных за размножение патогенов. Преимущества этих препаратов перед низкомолекулярными противовирусными средствами заключаются в следующем: они избирательно распознают целевые нуклеиновые кислоты (НК) посредством комплементарных взаимодействий, воздействуют на геном вируса, не затрагивая геном организма-хозяина, и могут быть быстро перенаправлены на любую целевую НК путем изменения последовательности нуклеотидов. Кроме того, ON хорошо растворимы в воде и менее токсичны, чем их нуклеозидные аналоги.

Концепция использования антисмысловых ON-препаратов была впервые предложена около 50 лет назад [1, 2]. Однако их применение в медицинской практике остается ограниченным из-за их слабого проникновения в клетки и низкой стабильности в клеточной среде. В последнее десятилетие антисмысловые ON изучались как потенциальные лекарственные средства от различных заболеваний, связанных с «вредными» нуклеиновыми кислотами [3]. Нусинерсен, будучи на сегодняшний день наиболее успешным препаратом на основе антисмысловых ON, продемонстрировал ценные терапевтические преимущества в клинике для лечения спинальной мышечной атрофии [4]. Показано, что ON эффективно ингибируют репликацию ВПГ в клеточной системе (более чем на 90%) [5, 6] и увеличивают выживаемость лабораторных животных [6, 7].

Использование наночастиц в качестве средств доставки лекарственных препаратов на основе НК является многообещающим подходом [8]. Наночастицы TiO₂ были идентифицированы как потенциальные носители фрагментов НК благодаря их способности проникать через плазматическую мембрану, стабильности и возможности модификации поверхности для иммобилизации различных соединений [9, 10].

Целью настоящего исследования была разработка эффективного подхода к подавлению ре-

пликации ВПГ 1-го типа (ВПГ-1). Для этой цели использованы наноконкомпозиты на основе наночастиц TiO₂, которые содержат антисмысловые ON, воздействующие на геном вируса. В работе использовались немодифицированные ON и ON с метилсульфонилфосфамидными межнуклеотидными группами.

Материалы и методы

В работе использовали пенициллин, стрептомицин и поли-L-лизин гидробромид (PL, poly-L-lysine hydrobromide; MW 15000–30000; Sigma-Aldrich, США); клетки VERO и ВПГ-1 штамм VR-3 (Вектор, Россия); модифицированную Дульбекко среду Игла (ДМСИ; Биолот, Россия); эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС; Gibco, США).

Наночастицы TiO₂ в форме анатаза (Ans, от англ. anatase; 5 нм) синтезированы, как описано ранее [11]. ON синтезировали амидофосфитным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) из соответствующих мономеров (Glen Research, США). Мезильные группы вводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [12].

Нативные и модифицированные ON очищали на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), используя колонку Zorbax SB-C18 (5 мкм; 4,6 × 150 мм; Agilent Technologies, США), в градиенте ацетонитрила (0–50%), содержащего 20 мМ ацетат триэтиламония, pH 7,0.

Молекулярные массы ON (MW, molecular weight) определяли методом ESI-MS на масс-спектрометре Agilent G6410A (Santa Clara, США) в режиме детектирования отрицательных ионов. MW (расчет/эксперимент) для ON-10, ON-10a и ON-10b составили 6731,2/6729,6, 7963,2/7962,5 и 6432,0/6430,2 соответственно.

Конъюгаты Ans/PL и наноконкомпозиты Ans/PL • ON синтезированы, как описано ранее [11]. Водный раствор PL интенсивно перемешивали с наночастицами Ans в течение 30 мин с последующей промывкой и суспендированием в 0,1 М NaCl. Получали конъюгаты Ans/PL с концентрацией 1 мг/мл. Элементный анализ Ans/PL: Ti – 42,2%, N – 4,8% и C – 13,2%, что соответствует содержанию ~2 мкмоль аминокрупп на 1 мг TiO₂. Ans/PL • ON (далее Ans~ON) получали после перемешивания Ans/PL (0,1 мг для наночастиц) и ON (2 нмоль) в течение 30 мин с последующей промывкой и суспендированием в 0,1 М NaCl. Наноконкомпозиты получены с практически количественным выходом (90–100%) с емкостью ~20 нмоль/мг по ON.

Оценка значений МПК для наночастиц и наноконкомпозитов в клетках VERO. Клетки VERO (10⁵ кл/мл) инкубировали в течение 48 ч в среде ДМСИ в 96-луночных планшетах (100 мкл на лунку) при 37°C и 5% CO₂ и промывали питательной средой без сыворотки. Образцы исследуемых наночастиц и наноконкомпозитов разбавляли ДМСИ

до необходимой концентрации (5–100 мМ) и инкубировали с клетками VERO при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 ч. Деструктивные изменения в клетках после окрашивания трипановым синим оценивали с помощью инвертированного микроскопа [13]. За максимально переносимую концентрацию (МПК) принимали максимальную концентрацию образцов, при которой в клетках не наблюдалось существенных изменений.

Вирулицидные свойства наночастиц и наноконпозитов. Вирусную суспензию ВПГ-1 (100 мкл) смешивали с тестируемыми образцами (Ans, Ans~ON-10 или Ans~ON-1) в среде ДМСИ (100 мкл). Конечные концентрации наночастиц Ans и ON в наноконпозитах Ans~ON составляли 0,25 мг/мл и 5 мкМ соответственно; тканевая цитопатическая доза (ТЦД), вызывающая гибель 50% инфицированных клеток, составляла 100 ТЦД₅₀/100 мкл. После инкубации (1 ч, 14°C) реакционные смеси разбавляли с шагом 10, вносили в культуру клеток VERO и инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Титр ВПГ-1 выражали как lgТЦД₅₀/мл. В качестве контроля использовали вирусную суспензию в питательной среде ДМСИ.

Противовирусная активность наноконпозитов. Противовирусную активность образцов изучали на клетках VERO, инфицированных ВПГ-1. Клетки VERO (10⁵ клеток/мл) в питательной среде ДМСИ, содержащей 10% ЭТС, высевали в 96-луночные планшеты (100 мкл на лунку) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и 100%-ной влажности.

Профилактический режим. После получения ~80% монослоя среду удаляли, а исследуемые образцы Ans~ON (2 мкМ или 5 мкМ в расчете на ON) добавляли в лунки в 100 мкл ДМСИ, содержащей 2% ЭТС. В качестве контроля использовали среду ДМСИ без добавления исследуемого образца. После инкубации клеток (37°C, 5% CO₂, влажность 100%, 4 ч) добавляли суспензию ВПГ-1; множественность инфицирования (MOI, multiplicity of infection) составляла 0,001 ТЦД₅₀/кл. Клетки инкубировали в течение 48 ч в тех же условиях. Вирусингибирующий эффект исследованных образцов выражали в lgТЦД₅₀/мл.

Лечебный режим. После достижения ~80%-го монослоя клеток VERO среду удаляли и к клеткам добавляли суспензию ВПГ-1 в среде ДМСИ, содержащей 2% ЭТС, в объеме 100 мкл/лунку (MOI 0,001 ТЦД₅₀/кл). После инкубации в стандартных условиях в течение 1 ч исследуемые образцы (2 мкМ или 5 мкМ в расчете на ON) добавляли в лунки в 100 мкл ДМСИ. Титр вируса оценивали через 48 ч, как описано выше для профилактического режима.

Оценка значений 50%-ной токсической концентрации (ТС₅₀) и 50%-ной эффективной концентрации (IC₅₀) для Ans~ON. Цитотоксичность и противовирусную эффективность исследуемых образцов оценивали колориметрическим методом по опти-

ческой плотности раствора красителя, поглощаемого живыми клетками в монослой [14].

Для оценки *цитотоксичности* исследуемые образцы в среде ДМСИ (0,1 мл, 0,025–50,0 мкМ для ON) вносили в лунки 96-луночных планшетов с клетками VERO. Контролем служили клетки в среде ДМСИ. После инкубации клеток (48 ч, 37°C, 5% CO₂) среду удаляли и МТТ-краситель (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид) в буфере (фосфатная соль Дульбекко; 0,75 мл, 1 мг/мл) вносили в каждую лунку. После инкубации клеток (90 мин, 37°C) раствор красителя удаляли, добавляли диметилсульфоксид (0,1 мл) и через 10 мин измеряли оптическое поглощение в каждой лунке на спектрофотометре Emax (Molecular Devices, США) при 540 нм, что является показателем количества жизнеспособных клеток в монослой.

Противовирусную активность образцов изучали в лечебном режиме. Клетки VERO в монослой на 96-луночных планшетах инфицировали вирусосодержащей жидкостью (0,1 мл) при MOI 0,001 ТЦД₅₀/кл. После адсорбции вируса (1 ч) вирусосодержащую жидкость удаляли и в каждую лунку добавляли исследуемые образцы (0,1 мл; 0,025–3 мкМ в расчете на ON). В качестве контроля использовали клетки, к которым не добавляли образец в ДМСИ. После инкубации клеток (48 ч, 37°C, 5% CO₂) культуральную среду удаляли. Цитопатическое действие образцов оценивали по жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста, как описано выше. Значения ТС₅₀ и IC₅₀ для каждого образца рассчитаны с помощью компьютерной программы SoftMaxPro-4.0 из зависимости оптического поглощения от концентрации исследуемого образца.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 12. Титр вируса в контроле и эксперименте рассчитывали по методу Спирмена–Кербера и выражали в lgТЦД₅₀/мл. Различия между результатами с экспериментальными и контрольными образцами считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Синтез наноконпозитов Ans~ON. Ранее мы продемонстрировали успешное использование TiO₂-наночастиц для доставки ON в клетки. Показано, что ON-содержащие наноконпозиты на основе таких наночастиц эффективно подавляют репликацию вируса гриппа A *in vitro* [11, 15] и *in vivo* [16, 17]. Наноконпозиты этого типа использовались также для коррекции артериальной гипертензии на модели крыс НИСАГ (крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией) [18].

В настоящей работе мы использовали тот же подход для подавления репликации ВПГ-1. Для получения ON-содержащих наноконпозитов мы

использовали TiO₂-наночастицы в кристаллической форме анатаза [11]. Наночастицы были предварительно покрыты PL с последующей иммобилизацией ON за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами ON и положительно заряженными аминогруппами полилизина. Таким образом были получены наноконпозиты Ans~ON [11].

Выбор эффективного ON для ингибирования репликации ВПГ-1. Эффективность использования антисмысловых ON зависит не только от их успешной доставки в клетки, но и от выбора подходящей мишени в геноме вируса. Мишенями обычно являются мРНК, которые соответствуют сайтам инициации трансляции или сайтам сплайсинга непосредственно ранних генов ВПГ-1. ON может связываться с комплементарным участком мРНК гена-мишени, что приводит либо к механическому блокированию мРНК, либо к ее деградации под действием РНКазы Н. Связывание с сайтами сплайсинга может модулировать альтернативный сплайсинг, что приводит к появлению различных вариантов белка. В обоих случаях ингибируется экспрессия соответствующего гена [19].

На основе анализа литературных данных [20] мы выбрали девять олигонуклеотидных последовательностей (ON-2 – ON-10), которые показали 90%-ное подавление репликации ВПГ-1. В качестве контрольного ON использовали ON-1, некомплементарный вирусному геному.

5'-ACGAGCGTGTACTTCTGCG (ON-1) [21];
5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG (ON-2) [22];
5'-ACGAGGGCGTTCCTCCTGCG (ON-3) [21];
5'-ACGTTCTCCTGCGGGAA (ON-4) [23];

5'-GGTCGTATGCGGCTGGAGGGTTCG (ON-5) [7];
5'-GGTGTCGGATATGGCCTCTGGTGG (ON-6) [7];
5'-ACCGAGGTCCATGTGCGTACGC (ON-7) [24];
5'-GCGGGTGAGCCCC (ON-8) [25];
5'-CGTTCCTCCTGCG (ON-9) [26];
5'-GCCGAGGTCCATGTCGTACGC (ON-10) [5].

Сравнение противогерпетической активности Ans~ON. Значения МПК для наночастиц и наноконпозитов в отношении клеток VERO были оценены как 0,5 мг/мл для Ans и 0,75 мг/мл для Ans~ON. Противовирусную активность наноконпозитов Ans~ON изучали при меньших, т.е. нетоксических концентрациях (0,05–0,25 мг/мл). При этом концентрации ON в наноконпозитах Ans~ON составляли соответственно 1–5 мкМ с учетом емкости наноконпозита по ON (20 нмоль/мг).

Все исследованные наноконпозиты, содержащие ON, комплементарные различным мРНК-мишеням генома ВПГ-1, оказались достаточно эффективными. Они подавляли репликацию вируса в профилактическом режиме на 1–5 и 0,5–3,5 порядка при концентрации ON в наноконпозитах 5 мкМ и 2 мкМ соответственно (рис. 1). Наиболее активным оказался наноконпозит, содержащий ON-10, нацеленный на сайт инициации трансляции мРНК гена, кодирующего белок UL13. Важно отметить, что этот ON может быть использован для подавления не только ВПГ-1, но также вируса герпеса второго типа (ВПГ-2) благодаря гомологичным нуклеотидным последовательностям их генов-мишеней [5]. Этот ON был выбран для дальнейших исследований.

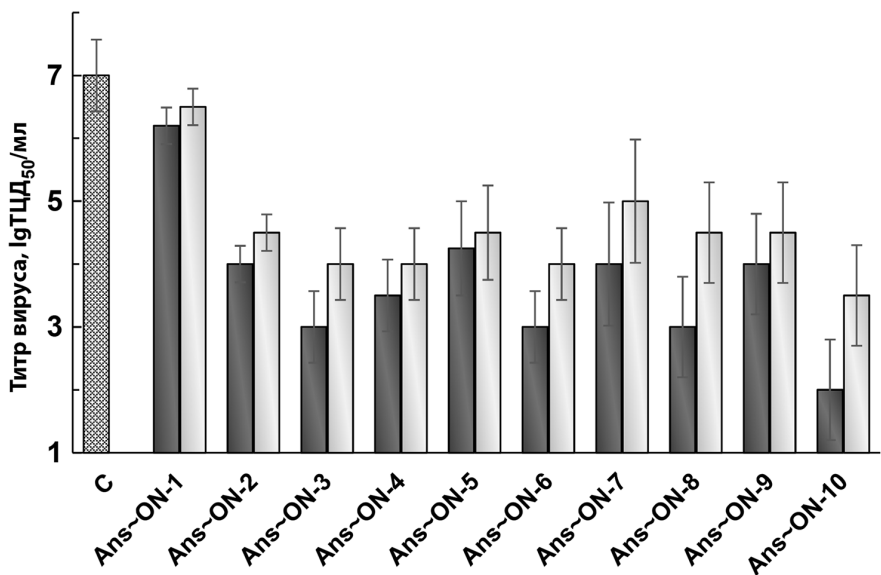


Рис. 1. Противовирусная активность наноконпозитов Ans~ON в отношении ВПГ-1 в профилактическом режиме. Концентрации ON в наноконпозитах составляли 5 мкМ (темные столбцы) и 2 мкМ (светлые столбцы). Титр вируса в клетках без добавления образца, С. Представленные средние значения, стандартные отклонения и различия в значениях титра вируса были рассчитаны с использованием метода Спирмена-Кербера. Разница между значениями титра в контроле и образцах с наноконпозитами при $p \leq 0,05$.

Наноккомпозит Ans~ON-1, содержащий ON, некомплементарный мРНК вирусного генома, оказался практически неактивным. Это указывает на избирательное действие ON, нацеленных на специфические участки вирусных мРНК.

Вирулицидность наночастиц Ans и нанокомпозитов Ans~ON. Мы проверили вирулицидные свойства наночастиц Ans и нанокомпозита Ans~ON-10 в бесклеточной системе. Для сравнения использовали нанокомпозит Ans~ON-1.

Титр вируса в бесклеточной системе после обработки наночастицами или нанокомпозитами практически не изменялся по сравнению с контролем (вирус без образцов) независимо от того, использовался ли в нанокомпозитах антисмысловый или контрольный ON (данные не приведены). Следовательно, ни наночастицы, ни нанокомпозиты не проявляют вирулицидных свойств в бесклеточных экспериментах даже при высоких концентрациях (20 мкМ для ON), которые значительно превышают концентрацию, приводящую к эффективному подавлению репликации вируса в клетках. Следовательно, вирус недоступен для воздействия до попадания в клетку, т.е. наночастицы не разрушают вирусную оболочку и не позволяют ON проникать внутрь вируса. Внутри клетки вирусный геном может высвободиться из вирусной оболочки, после чего его дальнейшие трансформации приводят к образованию вирусной мРНК, уязвимой для антисмысловых ON. Таким образом, только в клеточной системе ON может влиять на репликацию вируса.

Сравнение противогерпетического действия нативных и модифицированных ON. Для усиления биологического действия ON многие исследователи модифицируют их различными способами, что позволяет повысить устойчивость олигомеров к клеточным нуклеазам, изменить их взаимодействие с НК-мишенями, повысить способность проникать через цитоплазматическую мембрану и т.д. Мы сравнили противогерпетическую эффективность нативных и модифициро-

ванных ON при использовании нанокомпозитов Ans~ON.

Мы выбрали метилсульфонильную (мезильную) фосфамидную группу [12] для модификации сахарофосфатного остова ON-10. Эта модификация может обеспечить лучшую стабильность по отношению к клеточным нуклеазам, а также сохранение отрицательного заряда ON, необходимого для взаимодействия с аминокетонами полилизина при иммобилизации на наночастицах Ans/PL. Кроме того, этот тип модификации не исключает вовлечения РНКазы Н в механизм действия антисмыслового ON [27].

Мы использовали ON-10a с гапмер-подобной модификацией, когда модифицированы по две межнуклеотидные группы на обоих концах ON (четыре мезил-содержащие группы), и ON-10b с полностью модифицированным остовом (20 мезил-содержащих групп). Мы также использовали гапмер-версию контрольного ON-1a.

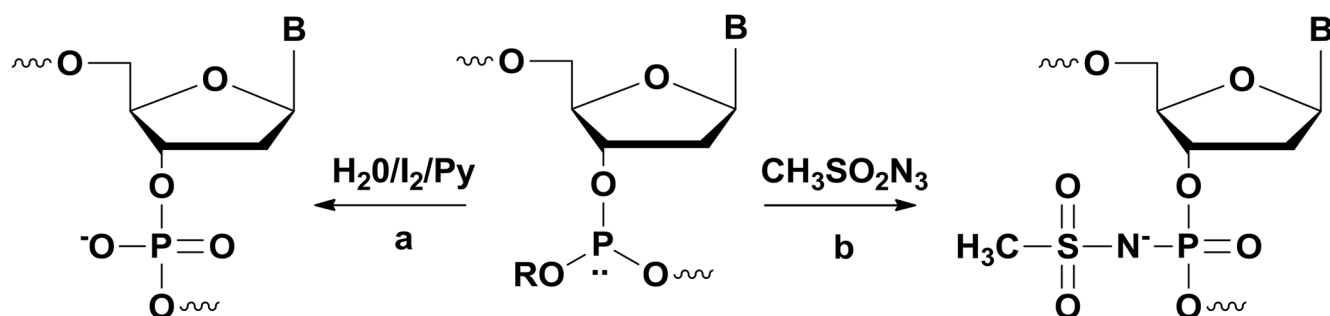
5'-G*C*CGAGGTCCATGTCGTAC*G*C ON-10a;
5'-G*C*C*G*A*G*G*T*C*C*A*T*G*T*C*
G*T*A*C*G*C ON-10b;

5'-A*C*GAGCGTGTACTTCTG*C*G ON-1a;

* метилсульфонилфосфамидные (мезилфосфамидные) межнуклеотидные группы.

На рис. 2 представлены структуры нуклеотидного звена после автоматизированного твердофазного олигонуклеотидного синтеза, включающего обычные (а) или альтернативные (б) стадии окисления фосфиттриэфирного звена, которые приводят к образованию фосфодиэфирной или мезилфосфамидной межнуклеотидных групп соответственно.

Мы сравнили противогерпетическую активность нанокомпозитов Ans~ON-10, Ans~ON-10a и Ans~ON-10b, содержащих нативные и модифицированные ON, в лечебном режиме, который более целесообразен в практическом смысле для лечения герпеса, чем профилактический режим. Результаты представлены на рис. 3.



В – нуклеиновое основание; R – цианоэтильная группа.

Рис. 2. Схема автоматизированного твердофазного синтеза ON, включающего обычные (а) или альтернативные (б) стадии окисления фосфиттриэфирного звена, которые приводят к образованию фосфодиэфирной или мезилфосфамидной межнуклеотидных групп соответственно.

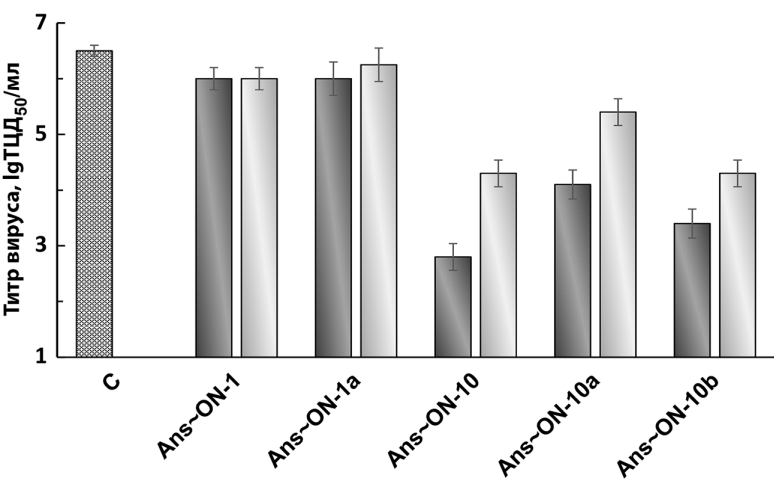


Рис. 3. Противовирусная активность наноконпозитов Ans~ON в отношении вируса ВПГ-1 в лечебном режиме. Концентрации ON в наноконпозитах составляли 2 мкМ (темные столбцы) и 1 мкМ (светлые столбцы); титр вируса в клетках без добавления образца, С. Представленные средние значения, стандартные отклонения и различия в значениях титра вируса были рассчитаны с использованием метода Спирмена-Кербера. Разница между значениями титра в контроле и образцах с наноконпозитами при $p \leq 0,05$.

Как и в предыдущих экспериментах, наноконпозиты, содержащие контрольные ON-1 и ON-1a, практически не подавляли репликацию вируса, что подтверждает избирательное действие антисмысловых ON. Присутствие четырех модифицирующих групп в ON-10a привело к снижению противовирусной активности, тогда как полностью модифицированный ON-10b проявил сравнимую активность с немодифицированным ON-10. При концентрации 1 мкМ подавление репликации вируса в обоих случаях произошло на два порядка, а при концентрации 2 мкМ – на 3,0 и 3,5 порядка соответственно. Вероятно, модификация всех межнуклеотидных групп компенсирует пониженную активность гапмера. Возможно, изменение схемы модификации позволит оптимизировать противовирусное действие антисмысловых ON, поскольку показано, что паттерн модификации, т.е. взаимное расположение модифицирующих групп вдоль олигонуклеотидной цепи, может радикально влиять на биологическую активность [28].

Таким образом, мы продемонстрировали, что модифицирующие группы в структуре ON не препятствуют проявлению их противовирусной активности. Можно предположить, что модифицированные ON будут более активны *in vivo*, как это было показано в нашей предыдущей работе [16].

Оценка значений IC_{50} , TC_{50} и индекса селективности (SI) для исследуемых наноконпозитов. Для оценки токсического и противовирусного действия наноконпозитов Ans~ON-10, Ans~ON-10a и Ans~ON-10b мы использовали колориметрический метод [29], изучив жизнеспособность клеток VERO после их обработки наноконпозитами в различных концентрациях в отсутствие и в присутствии ВПГ-1 соответственно. Противовирусное действие оценивали в лечебном режиме. Значения 50%-ной токсической концентрации (TC_{50}) и 50%-ной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для исследуемых наноконпозитов позволили рассчитать соответствующие значения SI ($SI = TC_{50}/IC_{50}$) (таблица). Достаточно высокие значения SI позволяют рассматривать исследованные наноконпозиты в качестве антисмысловых агентов для подавления репликации ВПГ-1.

Заклучение

Продемонстрировано успешное использование предложенных наноконпозитов, содержащих как нативные, так и модифицированные антисмысловые ON, для подавления репликации вируса ВПГ-1. Наиболее эффективный наноконпозит, содержащий ON, нацеленный на удачно выбранную мишень в геноме ВПГ-1, снижал репликацию вируса в культуре клеток на 3,5 порядка при концентрации 2 мкМ. Индекс селективности этого наноконпозита был оценен как ~100 в лечебном режиме.

Авторы благодарны докт. С. Яшник (Институт Катализа СО РАН) за предоставление наночастиц TiO₂. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-24-00184). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица

Значения TC_{50} , IC_{50} и SI для исследованных наноконпозитов

Образец	TC_{50} , мкМ ^{a)}	IC_{50} , мкМ ^{a)}	SI
Ans~ON-10	25,6	0,28	91,4
Ans~ON-10a	24,1	0,34	72,0
Ans~ON-10b	16,4	0,15	111,6

Концентрации (мкМ) для ON в наноконпозитах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967;8(37):3557–3562.
2. Zamecnik P., Stephenson M. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978;75(1):280–284.
3. Amado D.A., Davidson B.L. Gene therapy for ALS: A review. *Mol. Ther.* 2021;29(12):3345–3358.
4. Kulkarni J.A., Witzigmann D., Chen S., Cullis P.R., van der Meel R. Lipid nanoparticle technology for clinical translation of siRNA therapeutics. *Acc. Chem. Res.* 2019;52(9):2435–2444.
5. Draper K.G., Ecker D.J., Mirabelli C.K., Crooke S.T. Oligonucleotide therapies for modulating the effects of herpesviruses. Patent US 6310044 B1, 2001;30.10.2001.
6. Eide K., Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Bildfell R., Koelle D.M., Jin L. Reduction of herpes simplex virus type-2 replication in cell cultures and in rodent models with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Antivir. Ther.* 2010;15(8):1141–1149.
7. Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Eide K., Blouch R.E., Bildfell R., Iversen P., Jin L. Inhibition of HSV-1 ocular infection with morpholino oligomers targeting ICP0 and ICP27. *Antiviral Res.* 2009;84(2):131–141.
8. Weng Y., Huang Q., Li C., Yang Y., Wang X., Yu J., Huang Y., Liang X.J. Improved nucleic acid therapy with advanced nanoscale biotechnology. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2020;19(1):581–601.
9. Haghighi F.H., Mercurio M., Cerra S., Salamone T.A., Bianymotlagh R., Palocci C., Spica V.R., Fratoddi I. Surface modification of TiO₂ nanoparticles with organic molecules and their biological applications. *J. Mater. Chem. B.* 2023;11(11):2334–2366.
10. Chelobanov B.P., Repkova M.N., Bayborodin S.I., Ryabchikova E.I., Stetsenko D.A. Nuclear delivery of oligonucleotides via nanocomposites based on TiO₂ nanoparticles and polylysine. *Mol. Biol. (Mosc.)*. 2017;51(5):797–808.
11. Levina A.S., Repkova M.N., Shatskaya N.V., Zarytova V.F., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Zagrebelnyi S.N., Baiborodin S.I. Design of TiO₂-DNA nanocomposites for penetration into cells. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013;39(1):77–86.
12. Zharkov T.D., Markov O.V., Zhukov S.A., Khodyreva S.N., Kupryushkin M.S. Influence of combinations of lipophilic and phosphate backbone modifications on cellular uptake of modified oligonucleotides. *Molecules*. 2024;29(2):452.
13. 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.
14. Smee D.F., Morrison A.C., Barnard D.L., Sidwell R.W. Comparison of colorimetric and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *J. Virol. Methods*. 2002;106(1):71–79.
15. Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., Filipova E.I., Zarytova V.F. High antiviral effect of TiO₂-PL-DNA nanocomposites targeted to conservative regions of (–)RNA and (+)RNA of influenza A virus in cell culture. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016;7(4):1166–1173.
16. Levina A., Repkova M., Shikina N., Ismagilov Z., Kupryushkin M., Pavlova A., Mazurkova N., Pyshnyi D., Zarytova V. Pronounced therapeutic potential of oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles against highly pathogenic H5N1 influenza A virus *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;162:92–98.
17. Repkova M.N., Levina A.S., Ismagilov Z.R., Mazurkova N.A., Mazurkov O.Ju., Zarytova V.F. Effective inhibition of newly emerged A/H7N9 virus with oligonucleotides targeted to conserved regions of the virus genome. *Nucleic Acid Ther.* 2021;31(6):436–442.
18. Repkova M.N., Levina A.S., Seryapina A.A., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Zarytova V.F., Markel A.L. Toward gene therapy of hypertension: experimental study on hypertensive ISIAH rats. *Biochemistry (Mosc.)*. 2017;82(4):454–457.
19. Shen X., Corey D.R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(4):1584–1600.
20. Levina A.S., Repkova M.N., Zarytova V.F. Therapeutic nucleic acids against Herpes simplex viruses (a review). *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023;49(6):1243–1262.
21. Shoji Y., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y. Limited use of cationic liposomes as tools to enhance the antiherpetic activities of oligonucleotides in Vero cells infected with herpes simplex virus Type 1. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998;8(4):255–263.
22. Birch-Hirschfeld E., Knorre C.M., Stelzner A., Schmidtke M. Antiviral activity of antisense oligonucleotides against various targets of herpes simplex virus 1 (Hsv1) and Cocksackievirus B3 (Cvb3) genome. *Nucleos. Nucleot.* 1997;16(5–6):623–628.
23. Blumenfeld M., Meguenni S., Poddevin B., Vasseur M. Antisense oligonucleotides against herpes simplex virus types 1 and 2. Patent WO1995004141A1, 1995;09.02.1995.
24. Hoke G.D., Draper K., Freier S.M., Gonzalez C., Driver V.B., Zounes M.C., Ecker D.J. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(20):5743–5748.
25. Shoji Y., Ishige H., Tamura N., Iwatani W., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y. Enhancement of anti-Herpetic activity of antisense phosphorothioate oligonucleotides 5'-end modified with geraniol. *J. Drug Target.* 1998;5(4):261–273.
26. Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. Inhibition of herpes simplex virus 1 reproduction with hydrophobized antisense oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;203(2):959–966.
27. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019;116(4):1229–1234.
28. Kandasamy P., McClorey G., Shimizu M., et al. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide splice switching activity. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(10):5443–5466.

Поступила в редакцию 12.08.2024

После доработки 28.11.2024

Принята в печать 03.12.2024

RESEARCH ARTICLE

Effective in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by oligonucleotide-containing nanocomposites

M.N. Repkova¹ , V.F. Zarytova¹ , O.Yu. Mazurkov² , N.A. Mazurkova² ,
E.V. Makarevich² , E.I. Filippova² , M.D. Nekrasov¹ ,
M.S. Kupryushkin¹ , A.S. Levina^{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

The control of herpesvirus infections is a pressing public health issue because of the widespread prevalence of herpes simplex virus (HSV), which causes a variety of diseases ranging from mild primary skin lesions to severe and sometimes fatal encephalitis. The use of antisense oligonucleotides (ONs) to suppress HSV replication is a promising development in this field. To overcome one of the major obstacles in delivering ONs into cells, we have prepared nanocomposites, which are composed of antisense oligonucleotides immobilized on titanium dioxide nanoparticles in the form of anatase (Ans-ON). We have investigated the antiviral activity of several nanocomposites bearing oligonucleotides targeting different regions of the HSV-1 genome. Unmodified oligonucleotides and oligonucleotides with methylsulfonyl phosphoramidate internucleotide groups have been used in the work. The most effective nanocomposites reduced virus replication in the cell culture by 3–3.5 orders of magnitude. The selectivity index values of these nanocomposites have been evaluated as 90–110 in the post-infection mode.

Keywords: *nanocomposites; antisense oligonucleotides; TiO₂ nanoparticles (anatase); antiviral effect, herpes simplex virus*

Funding: The research was funded by the Russian Science Foundation, project number 23-24-00184.

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>

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>

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>

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>

Макаревич Елена Викторовна — канд. биол. наук, науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: elenasazmakarevich@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

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>

Некрасов Михаил Дмитриевич — науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: shuenja@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6510-499X>

Купрюшкин Максим Сергеевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: kuprummax@niboch.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2300-7809>

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>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.21

Влияние метилирования промоторов генов регуляции апоптоза на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов у облученных людей**Е.А. Блинова^{1, 2, *} , А.И. Котикова^{1, 2} , А.В. Аксеев^{1, 2}** ¹Лаборатория молекулярно-клеточной радиобиологии, Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Федеральное медико-биологическое агентство, Россия, 454141 г. Челябинск, ул. Воровского, д. 68А;²Кафедра радиационной биологии, Челябинский государственный университет, Россия, 454001, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, д. 123

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Апоптоз играет жизненно важную роль в поддержании баланса между пролиферацией клеток и их гибелью. Аберрантное метилирование промоторных регионов генов, регулирующих клеточную гибель, может влиять на их транскрипционную активность и, как следствие, на реализацию апоптоза. Дефекты в реализации апоптотического пути приводят к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических. Целью настоящего исследования был анализ влияния метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных областях генов *BCL2*, *BAX*, *TP53* и *MDM2* на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов периферической крови (ЛПК) у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию. Всего было обследовано 279 жителей прибрежных сел реки Течи (Южный Урал). Из них 145 человек подверглись хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов производственным объединением «Маяк» в реку Теча в период с 1949 по 1956 гг. (средняя накопленная доза облучения красного костного мозга обследованных лиц составила $734 \pm 49,40$ мГр). Анализ метилирования промоторных регионов генов *MDM2*, *TP53*, *BAX* и *BCL2* проводился методом метилспецифической полимеразной цепной реакции в реальном времени. Исследование апоптотической гибели ЛПК проводилось методом проточной цитометрии. Было установлено, что в отдаленном периоде после начала хронического радиационного воздействия в группе облученных людей наблюдались статистически значимые различия в распределении обследованных людей по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *BCL2* и *TP53* по сравнению с необлученными людьми. При оценке влияния метилирования на интенсивность клеточной гибели как в объединенной группе, так в группе облученных лиц регистрируется повышение частоты ЛПК на ранней и поздней стадии апоптоза в группах с гипометилированными участками промотора гена *MDM2*.

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие, клеточная гибель, метилирование ДНК, промоторные регионы генов, лимфоциты, апоптоз

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-12

Введение

Изменения в характере метилирования промоторных областей генов могут влиять на транскрипционную активность этих генов. Аберрантное метилирование в генах, регулирующих клеточную гибель, вероятно отражается на эффективности поддержания клеточного гомеостаза [1]. Апоптоз играет жизненно важную роль в регуляции клеточного баланса. Дефекты в реализации апоптотического пути приводят к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических [2].

Степень метилирования зависит от многих факторов: активности ДНК-метилтрансфераз, образа жизни (питание, курение, употребление алкоголя), возраста, а также экзогенных факторов окружающей среды. Ионизирующее излучение является одним из факторов, приводящих к изменению паттерна метилирования [3]. При этом может наблюдаться как гиперметилирование, так и гипометилирование в зависимости от дозы, вида радиационного воздействия, времени после облучения [4, 5]. Локальное гипометилирование

может привести к аномальной активации генов, включая онкогены, в то время как гиперметилирование способствует подавлению транскрипции, в том числе и генов-супрессоров опухолей [6]. Аналогичное явление может происходить в генах, регулирующих пути клеточной гибели. Такие эпигенетические модификации могут влиять на баланс между экспрессией про- и антиапоптотических белков, что отражается на реализации клеточной гибели.

Данная работа является продолжением цикла исследований о влиянии ионизирующего излучения на эпигенетические показатели у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие проживания на радиационно-загрязненных территориях (Южный Урал). В ранее проведенных исследованиях у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, наблюдались изменения показателей апоптоза как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия у облученных людей были выявлены количественные изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови (ЛПК) [7], регистрировалось снижение относительного содержания мРНК антиапоптотического гена *BCL-2* и увеличение относительного содержания мРНК проапоптотического гена *BAX* [8], наблюдались изменения в уровне метилирования промоторного региона гена *BCL2*, а также дозозависимое изменение метилирования промоторного региона гена *ATM* [9].

Целью настоящей работы было исследование влияния метилирования промоторных областей в генах *BCL2*, *BAX*, *TP53* и *MDM2* на интенсивность клеточной гибели ЛПК у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию.

Материалы и методы

Характеристика исследуемых лиц. В исследовании влияния метилирования промоторов генов апоптоза на интенсивность клеточной гибели ЛПК приняло участие 279 жителей прибрежных сел реки Течи, проходящих стационарное лечение в клинике Уральского научно-практического центра радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России (УНПЦ РМ ФМБА России). В группу облученных людей вошли 145 человек, проживающих на побережье реки Течи и подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов в 1949–1956 гг. в реку Теча. Облучение носило пролонгированный характер: внешнее γ -излучение вследствие нахождения вблизи реки и поймы, а также внутреннее β -излучение от радионуклидов (преимущественно Sr^{90} и Cs^{137}), поступающих в организм с молоком, овощами, мясом и рыбой [10]. Средняя накопленная доза облучения красного костного мозга (ККМ) у облученных людей составила $734 \pm 49,40$ мГр, а средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (ТиПЛО) – $98,10 \pm 8,93$ мГр.

Группу сравнения составили 134 человека, чьи накопленные дозы облучения ККМ не превышали фоновый уровень за весь период жизни (70 мГр) [11]. Средняя накопленная доза облучения ККМ в группе сравнения была $17,40 \pm 1,44$ мГр, а средняя накопленная доза облучения ТиПЛО – $7,07 \pm 0,84$ мГр. Подробная характеристика исследуемых людей представлена в табл. 1.

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, одобренное этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 2 от 20 июля 2021 г.).

Таблица 1

Характеристика обследованных лиц

Характеристика группы		Облученные люди N = 145	Группа сравнения N = 134
Возраст на момент обследования, лет: M $\pm$ SE (min–max)		71,86 $\pm$ 0,46 (62–87)	65 $\pm$ 0,61 (54–87)
Пол, человек (%)	Мужчины	50 (35)	47 (35)
	Женщины	95 (65)	87 (65)
Этническая принадлежность, человек (%)	Славяне	60 (41)	80 (60)
	Татары	66 (46)	45 (34)
	Башкиры	19 (13)	9 (6)
Поглощенная доза облучения ККМ, мГр: M $\pm$ SE (min–max) [10]		734 $\pm$ 49,40 (77,70–3507)	17,40 $\pm$ 1,44 (0–68)
Поглощенная доза облучения ТиПЛО, мГр: M $\pm$ SE (min–max)		98,10 $\pm$ 8,93 (0,29–645)	7,07 $\pm$ 0,84 (0–39,40)

Анализ уровня метилирования промоторных областей генов. Для исследования процента метилирования CpG-динуклеотидов использовали образцы ДНК, взятые из «Коллекции биологических образцов» УНПЦ РМ ФМБА России [13]. Геномную ДНК подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора реагентов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific, США). Конвертированную ДНК амплифицировали с праймерами, специфичными для метилированных участков промоторных регионов генов *MDM2*, *TP53*, *BAX* и *BCL2*. Последовательности праймеров были сконструированы с использованием программы Methyl Primer Express Software V.1.0 (Applied Biosystems; США) и синтезированы фирмой ДНК-Синтез (Россия). Последовательность праймеров: *TP53* (Forward: GTAGTTTGAACGTTTTATTTTGGC; Reverse: CCTACTACGCCCTCTACAAACG); *MDM2* (Forward: TTTGTCTGGGTATTAGTGTGAAC; Reverse: CCTTTTACTACAATTTTCGAAACGTA); *BCL-2* (Forward: GTTTTATAGCGTTCGGTATCGG; Reverse: AAATCTCTATCCACGAAACCGC); *BAX* (Forward: GAGGGGTAGAAATTTTCGGAT; Reverse: ATAATACGAACGACAAACCCG). Амплификацию проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Scientific, США). В качестве реакционной смеси использовали 5× qPCRmix-HS (Евроген, Россия). Температурный и временной режимы ПЦР-РВ: первая денатурация (95°, 5 мин), денатурация (95°, 30 с), отжиг (температура отжига для каждого гена) и элонгация (72°, 30 с) — 50 циклов; кривая плавления (95°, 10 с; 60°, 1 мин; 95°, 15 с; 60°, 15 с). В качестве контролей для оценки процента метилирования исследуемых CpG-динуклеотидов использовали коммерческие образцы 100% метилированной ДНК (CpG Methylated Human Genomic DNA; Thermo Fisher Scientific, США) и 0% метилированной ДНК (Human Genomic DNA: Male; Promega, США).

Анализ клеточной гибели ЛПК. Этапы пробоподготовки и методологии исследования подробно описаны в ранее [14].

Апоптотическая гибель ЛПК оценивалась с помощью набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD, США), в котором компонент аннексин V-FITC (AnnV-FITC) связывается с молекулой фосфатидилсерина на поверхности мембраны, служащей маркером процесса апоптоза. Маркером некроза является проникновение в клетку ДНК тропного красителя — пропидия йодида. Анализ пробы проводился на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Результаты представляли собой процентное соотношение клеток: ранняя стадия апоптоза (AnnV-FITC+/PI-), поздняя стадия апоптоза (AnnV-FITC+/PI+) и некроз (AnnV-FITC-/PI+) [14].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного комплекса SPSS Statistics 17.0. Для сравнения распределений обследованных лиц по уровню метилирования использовали критерий Хи-квадрат (χ^2) с поправкой Йетса. Сравнение выборок данных клеточной гибели проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Корреляционный анализ с целью оценки влияния дозы облучения ККМ и возраста на уровень метилирования проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции (Rs) по Спирмену.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было получено распределение обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *TP53*, *MDM2*, *BCL2* и *BAX* в группе хронически облученных людей и у людей из группы сравнения (рисунок).

Распределение облученных людей по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *BCL2* ($\chi^2 = 16,56$; $p = 0,002$) и *TP53* ($\chi^2 = 9,59$; $p = 0,05$) статистически значимо отличалось от такового для группы контроля. В группе сравнения количество человек с уровнем метилирования CpG-динуклеотидов в промоторе гена *BCL2* от 0 до 10% составило 97,8% и 1,1 % с уровнем метилирования 50–100%, в то время как 12% людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, имели уровень метилирования 50–100%. При сравнении только этих двух групп значение χ^2 с поправкой Йетса составило 8,04 ($p = 0,005$). Основные различия в распределении обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторе гена *TP53* были в диапазоне от 0% до 5% и от 25% до 100%. В группе сравнения у 22% обследованных регистрировалось гипометилирование, а у 7,8% гиперметилирование, в то время как в группе облученных таких людей было 11,8% и 1,3% соответственно. При сравнении отдельно только этих групп также наблюдались статистически значимые различия ($\chi^2 = 7,27$; $p = 0,03$). Однако следует заметить, что как в группе облученных, так и в группе сравнения у большинства обследованных лиц уровень метилирования составил от 5% до 25%. Для остальных генов не было найдено статистически значимых различий в распределении обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов.

В доступной литературе имеется информация об изменении уровня метилирования промоторов различных генов в лейкоцитах крови: так, у ликвидаторов аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) наблюдалось гиперметилирование CpG-динуклеотидов промоторов генов *p16/INKA* и *GSTP1* [15], а у облученных работни-

ков реакторного производства производственного объединения «Маяк» гиперметилование CpG-островков промоторов генов *GSTP1*, *Tp53* и *SOD2* [16]. Однако стоит заметить, что характер радиационного воздействия и дозы облучения как у ликвидаторов аварии на ЧАЭС, так и у работников ПО «Маяк» отличались от этих показателей для лиц, обследованных в нашей работе. Большая часть работников ПО «Маяк» подвергалась внешнему γ -излучению, контактировала с аэрозолями плутония, а часть работников подверглась внутреннему действию α -излучений, суммарная доза внешнего γ -облучения составила от 0,96–4,1 Гр [16]. В наших исследованиях мы не наблюдаем явно выраженного гиперметилования CpG-динуклеотидов в промоторных областях исследуемых генов, у большинства людей в обеих группах уровень метилирования не превышает 10%. Такие различия в результатах, вероятно, могут быть обусловлены разным характером радиационного воздействия (хроническое низкоинтенсивное радиационное воздействие) и суммарными накопленными дозами.

Для выявления роли радиационного воздействия, а также влияния возраста на уровень метилирования был проведен корреляционный анализ. Однако, согласно полученным результатам, не было установлено корреляционных связей между уровнем метилирования CpG-динуклеотидов

в промоторных регионах изученных генов и дозой облучения ККМ, дозой облучения ТиПЛО, а также достигнутым возрастом (табл. 2).

Дифференциальное метилирование промоторных регионов генов, регулирующих клеточную гибель может приводить к изменению количества мРНК и, следовательно, концентрации белковых продуктов генов, что может влиять на реализацию клеточной гибели. В связи с этим на следующем этапе работы было проведено исследование клеточной гибели в зависимости от уровня метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *TP53*, *MDM2*, *BAX* и *BCL2*.

Таблица 2

Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (Rs) процента метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах исследуемых генов с поглощенной дозой облучения ККМ и ТиПЛО, а также возрастом пациента на момент исследования

Ген	Доза облучения ККМ	Доза облучения ТиПЛО	Возраст на момент исследования
MDM2	0,01 (0,9)	0,06 (0,4)	0,1 (0,3)
BAX	0,02 (0,8)	-0,01 (0,9)	-0,1 (0,2)
BCL2	0,08 (0,2)	0,12 (0,08)	-0,01 (0,9)
TP53	0,06 (0,4)	-0,03 (0,6)	-0,1 (0,4)

Примечание: В скобках указано *p*-значение, рассчитанное для коэффициентов ранговой корреляции Спирмена (Rs).

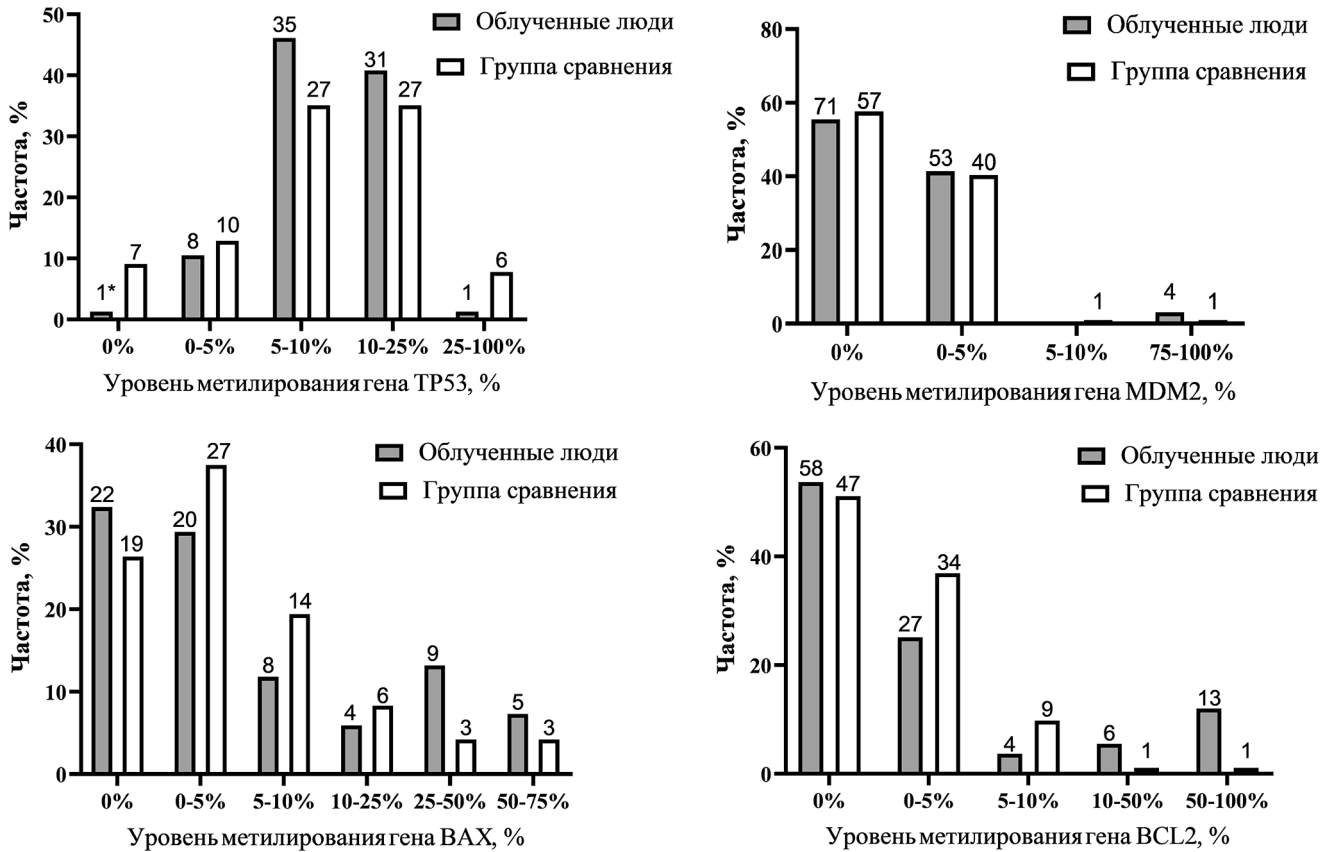


Рисунок. Распределение обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *TP53*, *MDM2*, *BAX* и *BCL2*. По оси абсцисс отложен процент метилирования CpG-динуклеотидов, по оси ординат – процент обследованных людей; цифры над столбцами указывают количество человек в каждой группе.

Таблица 3

Интенсивность клеточной гибели ЛПК в зависимости от уровня метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *TP53*, *MDM2*, *BAX* и *BCL2*

Уровень метилирования	Облученные люди			Объединенная группа		
	Ранняя стадия, %	Поздняя стадия, %	Некроз, %	Ранняя стадия, %	Поздняя стадия, %	Некроз, %
Ген <i>TP53</i>						
До 10%	2,19 (0,25–8,08)	0,01 (0–0,04)	0,03 (0,01–0,06)	2,99 (0,83–8,08)	0,01 (0–0,17)	0,02 (0,01–0,04)
Более 10%	2,24 (0,57–6,38)	0,01 (0–0,11)	0,03 (0,01–0,09)	1,91 (0,53–5,29)	0,02 (0–0,09)	0,04 (0,01–0,07)
Ген <i>MDM2</i>						
0%	6,38 (2,72–10,29)	0,06 (0,02–0,11)	0,02 (0,01–0,05)	6,51 (2,72–9,91)	0,07 (0,02–0,15)	0,02 (0,01–0,06)
Более 5%	1,01 (0,17–3,95) <i>p</i> = 0,0002	0,01 (0–0,06) <i>p</i> = 0,001	0,03 (0,01–0,07)	1,39 (0,36–3,77) <i>p</i> = 0,001	0,01 (0–0,02) <i>p</i> = 0,004	0,03 (0,02–0,06)
Ген <i>BAX</i>						
До 10%	1,81 (0,21–6,71)	0,01 (0–0,09)	0,04 (0,01–0,09)	2,71 (0,55–7,03)	0,01 (0–0,08)	0,03 (0,01–0,06)
Более 10%	4,81 (1,65–9,32)	0,02 (0,01–0,09)	0,02 (0,01–0,03)	4,82 (1,79–9,32)	0,03 (0,01–0,11)	0,02 (0,01–0,05)
Ген <i>BCL-2</i>						
0%	6,38 (4,08–10,25)	0,08 (0,03–0,11)	0,02 (0,01–0,06)	5,13 (3,19–10,25)	0,08 (0,03–0,11)	0,03 (0,01–0,09)
Более 5%	2,62 (0,42–9,33)	0,02 (0,01–0,11)	0,03 (0,01–0,04)	6,38 (1,85–,32)	0,06 (0,01–0,15)	0,02 (0,01–0,04)

Было обнаружено, что у обследованных лиц как в объединенной группе, включающих облученных лиц и группу сравнения, так и отдельно в группе облученных людей наблюдается изменение частоты клеток на ранней и поздней стадии апоптоза в зависимости от уровня метилирования CpG-динуклеотидов промотора гена *MDM2* (табл. 3). В случае гипометилирования CpG-динуклеотидов в промоторе *MDM2* регистрируется повышение количества клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза по сравнению с уровнем метилирования более 5%. Анализ корреляции уровня метилирования CpG-динуклеотидов в гене *MDM2* с частотой клеток, находящихся на ранней и поздней стадии апоптоза, также показал статистически значимую отрицательную корреляционную связь как в объединенной группе ($R_s = -0,46$; $p < 0,001$ для частоты апоптоза на ранней стадии и $R_s = -0,45$; $p < 0,001$ для частоты апоптоза на поздней стадии), так и в группе облученных лиц ($R_s = -0,53$; $p < 0,001$ для ранней стадии и $R_s = -0,46$; $p < 0,001$ для поздней стадии апоптоза). При этом для генов, которые различались по уровню метилирования, у облученных лиц и группы сравнения статистически значимых различий не обнаружено.

Ген *MDM2* функционально может проявлять признаки как онкогена, так и супрессора опухолей. Показано, что белок MDM2 является нега-

тивным регулятором убихинон-оксидоредуктазы, что приводит к снижению митохондриального дыхания, выраженному окислительному стрессу и активации апоптоза по митохондриальному пути [17]. В нашем исследовании мы наблюдаем увеличение интенсивности апоптоза ЛПК как на ранней стадии, так и на поздней стадии в группах, где отсутствует метилирование изученных CpG-островков в промоторной области гена *MDM2* (0% метилирования), что, вероятно, указывает на реализацию апоптотической гибели именно по этому пути. Однако стоит заметить, что с гена *MDM2* синтезируется множество транскриптов мРНК, это приводит к экспрессии полноразмерного *MDM2* дикого типа, а также возникновению множества изоформ [18]. В нашей работе мы рассматривали уровень метилирования лишь одного участка промоторной области этого гена, поэтому для подтверждения полученных результатов требуются дополнительные исследования.

Закключение

В результате проведенного исследования было установлено, что в отдаленном периоде, спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия, в группе облученных лиц (в диапазоне дозы облучения ККМ от 77,70 до 3507 мГр) наблюдались статистически значимые

различия в распределении обследованных людей по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *BCL2* и *TP53* по сравнению с необлученными людьми. В обеих группах преобладали люди пожилого возраста. Однако корреляционных связей с дозовым фактором, а также возрастом на момент обследования установлено не было.

При оценке влияния метилирования на интенсивность клеточной гибели как в объединенной группе, так в группе облученных лиц регистрируется повышение частоты ЛПК на ранней и поздней стадии апоптоза в группах с гипометилированием CpG-островков в промоторе гена *MDM2*. Результаты корреляционного анализа также подтверждают связь интенсивности апоптоза

с клеточной гибелью с уровнем метилирования гена *MDM2*. Однако для подтверждения полученных результатов требуется проведение дальнейших исследований метилирования всех промоторных областей гена *MDM2*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства в рамках выполнения федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 гг. и на период до 2030 г.» (контракт № 27.501.21.2 от 11.06.2021 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России протокол № 2 от 20 июля 2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gopisetty G., Ramachandran K., Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol.* 2006;43(11):1729–1740.
2. Pfeffer C.M., Singh A.T.K. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(2):448.
3. Antwi D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D., Ruden D.M., Zielske S.P. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. *Epigenetics.* 2013;8(8):839–848.
4. Bae J.H., Kim J.G., Heo K., Yang K., Kim T-O., Yi J.M. Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in coloncancer. *BMC Genomics.* 2015;16(56):12.
5. Lahtz C., Bates S.E., Jiang Y., Li A.X., Wu X., Hahn M.A., Pfeiffer G.P. Gamma irradiation does not induce detectable changes in DNA methylation directly following exposure of human cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e44858.
6. Hatzia Apostolou M., Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68:1681–1702.
7. Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2020;65(4):36–42.
8. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск.* 2020;29(2):89–100.
9. Blinova E.A., Nikiforov V.S., Kotikova A.I., Yanievskaya M.A., Akleyev A.V. Methylation status of apoptosis genes and intensity of apoptotic death of peripheral blood lymphocytes in persons chronically exposed to radiation. *Mol. Biol.* 2022;56(6):993–1002.
10. *Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи.* Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга; 2016. 390 с.
11. Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 2.6.1.2523-09. *Нормы радиационной безопасности* (НРБ-99/2009). Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 100 с.
12. Дегтева М.О., Напье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е.А., Бугров Н.Г., Крестинина Л.Ю., Аклеев А.В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2019;3:46–53.
13. Блинова Е.А., Кореченкова А.В., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. «Коллекция биологических образцов» Свидетельство о регистрации базы данных RU 2024621345, 28.03.2024. Заявка от 07.02.2024.
14. Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. Интенсивность апоптоза лимфоцитов крови у облученных лиц с облигатными формами предраковых заболеваний. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;176(8):233–236.
15. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.B. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ. Res.* 2016;146:10–17.
16. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2017;57(4):341–356.
17. Elkholi R., Abraham-Enachescu I., Trotta A.P., Rubio-Patiño C., Mohammed J.N., Luna-Vargas M.P.A., Gelles J.D., Kaminetsky J.R., Serasinghe M.N., Zou C., Ali S., McStay G.P., Pfleger C.M., Chipuk J.E. MDM2 integrates cellular respiration and apoptotic signaling through NDUFS1 and the mitochondrial network. *Mol. Cell.* 2019;74(3):452–465.e7.
18. Jeyaraj S., O'Brien D.M., Chandler D.S. MDM2 and MDM4 splicing: an integral part of the cancer spliceome. *Front Biosci.* 2009;14:2647–2656.

Поступила в редакцию 10.07.2024

После доработки 05.11.2024

Принята в печать 26.12.2024

RESEARCH ARTICLE

Effect of gene promoter methylation of apoptosis regulation on the intensity of lymphocyte cell death in exposed people

E.A. Blinova^{1, 2, *} , A.I. Kotikova^{1, 2} , A.V. Akleyev^{1, 2} 

¹Laboratory of Molecular and Cellular Radiobiology, Urals Research Center for Radiation Medicine, Federal Medical Biological Agency, Vorovsky ul., 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia;

²Department of Radiation Biology, Chelyabinsk State University, Bratiev Kashirinykh ul., 129, Chelyabinsk, 454001, Russia

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Apoptosis plays a vital role in maintaining the balance between proliferating cells and their death. Modifications in the methylation level of promoter regions of genes regulating cell death can affect the transcriptional activity of these genes and, consequently, the execution of apoptosis. At the same time, any defects in the implementation of the apoptotic pathway lead to the development of various diseases, including cancer. The objective of the study was to analyse the effect of methylation of promoter regions in *BCL2*, *BAX*, *TP53* and *MDM2* genes on the intensity of cell death of peripheral blood lymphocytes in individuals exposed to chronic low dose rate radiation. A total of 279 residents of the Techa riverside villages (Southern Urals) were examined, 145 of them were exposed to chronic low dose rate radiation due to the discharge of radioactive waste by the Mayak Production Association into the Techa River between 1949 and 1956 (the average accumulated dose to red bone marrow was 734 ± 49.40 mGy). Methylation of promoter regions of *MDM2*, *TP53*, *BAX* and *BCL2* genes was analysed by methyl-sensitive real-time PCR. Apoptotic death of peripheral blood lymphocytes (PBLs) was studied by flow cytometry method. It was found that in the long-term period, after the onset of chronic radiation exposure, statistically significant differences were observed in the distribution of the examined people in the group of exposed people by the level of methylation of promoter regions of *BCL2* and *TP53* genes in comparison with unexposed people. When assessing the effect of methylation on the intensity of cell death in both the combined group and the group of exposed individuals, an increased frequency of PBLs at early and late stages of apoptosis is registered in the groups with hypomethylated *MDM2* gene promoter.

Keywords: chronic radiation exposure, cell death, DNA methylation, promoter regions of genes, lymphocytes, apoptosis

Funding: The study was conducted with the financial support of the Federal Medical and Biological Agency as part of the Federal Target Program “Ensuring Nuclear and Radiation Safety for 2016–2020 and for the period until 2030” (Contract No. 27.501.21.2 dated June 11, 2021).

Сведения об авторах

Блинова Евгения Андреевна — канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии Уральского научно-практического центра радиационной медицины ФМБА России, доц. кафедры радиационной биологии Челябинского государственного университета. Тел.: 8-351-232-79-14; e-mail: blinova@urcrm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2567-7945>

Котикова Алиса Игоревна — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, г. Челябинск, Россия; аспирант кафедры радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия. Тел.: 8-351-232-79-14; e-mail: kotikova@urcrm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1695-1340>

Аклеев Александр Васильевич — докт. мед. наук, проф., директор ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, заведующий кафедрой радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия. Тел.: 8-351-232-79-14; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2583-5808>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 574.524

Содержание, состав и динамика фотосинтетических пигментов в водохранилищах реки Кальмиус Донецкой Народной Республики**Э.И. Мирненко** *Кафедра ботаники и экологии, биологический факультет, Донецкий государственный университет, Россия, 283001, г. Донецк, Щорса, д. 46
e-mail: eduard_mirnenko@list.ru*

В работе представлены данные о содержании, составе, а также межгодовой и сезонной динамике фотосинтетических пигментов в Нижнекальмиусском и Старобешевском водохранилищах реки Кальмиус Донецкой Народной Республики. Среднее содержание хлорофилла *a* по водохранилищам составляло от $54,24 \pm 1,4$ до $106,47 \pm 1,5$ мкг/л. Нижнекальмиусское водохранилище характеризовалось более высокими значениями концентрации фотосинтетических пигментов при меньшем биоразнообразии фитопланктона. Наличие постоянной доминантной группы и повышенных концентраций биогенных элементов характеризует экосистему водохранилища как нестабильную. Высокие значения концентрации хлорофилла *a* определяются летним «цветением» цианобактерий. Рост абсолютного и относительного числа цианобактерий свидетельствует о переходе к эвтрофному типу водоема. Старобешевское водохранилище характеризовалось широкой вариабельностью значений хлорофилла *a* при отсутствии однопикового характера развития фитопланктона. Межгодовые изменения хлорофилла *a* косвенно зависят от температурного фактора и в большей степени — от варьирования концентраций и биогенных элементов. Ежегодное увеличение температуры приводит к удлинению периода максимальных концентраций хлорофилла *a*. В целом экосистема Старобешевского и Нижнекальмиусского водохранилища справляется с антропогенным воздействием.

Ключевые слова: фотосинтетические пигменты, хлорофилл *a*, фитопланктон, водохранилища, экосистема, Донбасс

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-15

Введение

Река Кальмиус расположена в Северном Приазовье, при этом ее бассейн территориально не выходит за границы центрального Донбасса. Длина реки от истока до устья составляет 209 км. Сток реки зарегулирован плотинами, на месте которых созданы водохранилища для нужд населения и промышленности Донбасса. В верхнем участке реки вблизи истока расположено Верхнекальмиусское водохранилище, обеспечивающее питьевой водой г. Донецк. В среднем участке реки расположены два водохранилища (Нижнекальмиусское и Старобешевское). Нижнекальмиусское водохранилище используется для водообеспечения промышленных предприятий города. Ниже по течению находится Старобешевское водохранилище, которое выполняет функцию водоема-охладителя Старобешевской теплоэлектростанции (ТЭС). В нижнем участке реки Кальмиус зарегулировано Павлопольское водохранилище, (находящееся в 30 км от Азовского моря) которое интенсивно

используется для ирригации близлежащих сельскохозяйственных угодий [1–3]. Следовательно, по гидрологическим характеристикам река Кальмиус относится к категории малых рек с высокой степенью антропогенного воздействия, что вызывает большой интерес для ее исследования.

Фитопланктон является первичным продуцентом органического вещества в водных экосистемах. Он формирует трофический базис и энергетическую основу для всех последующих этапов продукционного процесса в водоеме. Одним из наиболее распространенных методов изучения экологического состояния водоемов является определение содержания фотосинтетических пигментов фитопланктона [4, 18, 19].

Хлорофилл *a* (хл *a*) — основной пигмент фитопланктона, определяется как универсальная эколого-физиологическая характеристика состояния фотосинтетической активности водорослей, обеспечивающая интегральную оценку процессов, протекающих в водных экосистемах. Хлорофиллы

b и *c* играют важную роль как вспомогательные пигменты. Их присутствие дополняет спектральный диапазон поглощения света, что способствует более эффективному использованию доступной энергии фитопланктоном [5].

Удельное содержание хл *a* в биомассе фитопланктона изменчиво и зависит от ряда факторов, что усложняет определение общего переходного коэффициента между концентрацией хлорофилла и биомассой, который может быть применим для водоемов различных типов [6].

Исследование биоразнообразия фитопланктона реки Кальмиус ведется с 50-х гг. XX в. Согласно литературным данным, за последние 20 лет фитопланктон водохранилищ и притоков бассейна реки Кальмиус был представлен пятью отделами: Heterokontophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Cyanobacteria и Dinoflagellata, при этом доминируют диатомовые и протококковые водоросли (в совокупности до 76 % от общего состава альгофлоры). Цианобактерии демонстрируют сравнительно низкий уровень биоразнообразия (от 4 % до 16 % от общего состава альгофлоры). Эвгленовые и динофлагелляты представлены единичными видами (от 1% до 8% от общего состава альгофлоры). Данные по фотосинтетическим пигментам носят отрывочный характер и требуют дальнейших исследований [20, 21]. На современном этапе проходит комплексное изучение растений в экосистемах Донбасса на базе кафедры ботаники и экологии Донецкого государственного университета [7–10]. Объектом исследования являются водохранилища, зарегулированные на реке Кальмиус.

Целью настоящей работы стало исследование состава фотосинтетических пигментов фитопланктона в водохранилищах бассейна реки Кальмиус для оценки современного экологического состояния вод.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили 126 фиксированных проб воды, (отобранных с периодичностью ~2 раза в месяц) в водах Нижнекальмиусского и Старобешевского водохранилищ в период 2019–2023 гг. (рис. 1).

Оценку количества фотосинтетических пигментов в фитопланктоне осуществляли спектрофотометрическим методом, основанным на измерениях концентрации хл *a*, пигментного индекса и дополнительных пигментов (хлорофиллов *b*, $c_1 + c_2$ и каротиноидов) [11, 12]. Взвесь, осажденную на фильтр из стекловолокна, гомогенизировали в ступке вместе с фильтром. После добавления туда же нескольких кубических сантиметров 90%-го ацетона в течение 1 мин растирали. Полученный экстракт сливали в центрифужную пробирку. Светорассеивающую взвесь удаляли из экстракта методом центрифугирования. После этого экстракт переносили в стеклянную мерную пробирку, чтобы довести его объем до объема фотометрической кюветы. Полученный экстракт изучали методом спектрофотометрирования [12–14].

При спектрофотометрировании использовали кюветы с рабочей длиной 1 см и брали отсчеты оптических плотностей при четырех длинах волн: 664, 647, 630 и 750 нм. Спектрофотометрирование

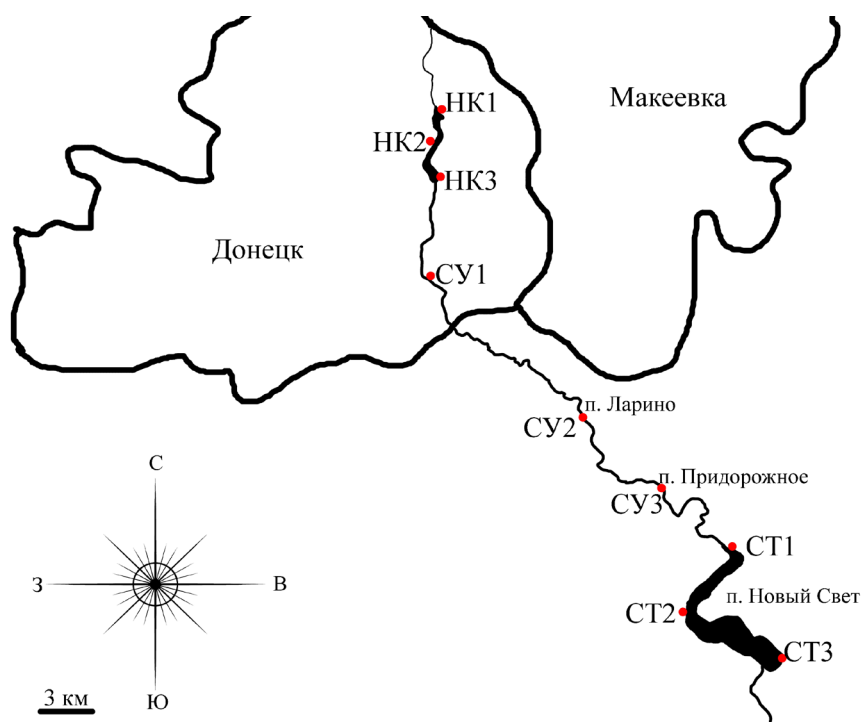


Рис. 1. Карта-схема расположения точек отбора проб. НК – Нижнекальмиусское водохранилище; СТ – Старобешевское водохранилище.

производили дважды, до и после подкисления экстракта несколькими каплями раствора соляной кислоты в ацетоне. После добавления кислоты измерение проводили на двух длинах волн: 664 и 750 нм [13, 14].

Определение азота проводили методом Кельдаля (с добавлением селена), определение фосфора проводили спектрофотометрическим методом ИСО 6878 [15].

Температуру воды и воздуха определяли с помощью лабораторного ртутного термометра в период отбора проб. Концентрацию растворенного кислорода определяли с помощью йодометрического титрования, методом Винклера [16]. Видовой состав и количественные характеристики фитопланктона (численность и биомассу) определяли методом прямого микрокопирования при помощи микроскопа Primo Star Carl Zeiss (Carl Zeiss, Германия). Оценку численности фитопланктона делали при помощи камеры Горяева в трех повторностях с установлением среднего значения. Расчет биомассы проводили спектрофотометрическим методом [16].

Таксономическое положение видового состава было описано в соответствии с международной базой данных Algaebase [17]. Статистическую обработку проводили с помощью компьютерных программ Statistica 10 и Excel.

Результаты и обсуждение

Динамика температуры показала высокую степень неоднородности на исследуемых участках водохранилищ. Для Нижнекальмиусского водохранилища среднегодовая температура варьировала в пределах 17,63–21,04°C, при этом максимум отмечен для августа 2021 г. – 29,7°C. Водный бассейн Старобешевского водохранилища характеризовался тенденцией к быстрому прогреванию (за счет притока подогретых вод Старобешевской ТЭС), что вызывало удлинение периода повышенных температур и отсутствие ледостава. Максимальная температура была отмечена для августа 2021 г. – 42°C вблизи канала спуска теплых вод. Среднего-

довая температура Старобешевского водохранилища варьировала в пределах 19,29–21,07°C и была больше этого показателя для Нижнекальмиусского (табл. 1).

Содержание растворенного кислорода имела высокую изменчивость в зависимости от паводков, вертикальной стратификации, эвтрофирования, «цветения» фитопланктона, термоклина и ряда других экологических и климатических параметров. Минимальные значения наблюдались в Нижнекальмиусском водохранилище в августе 2021 г. (0,86 мг O₂/л), что являлось критически низким показателем, приближенным к аналитическому нулю.

В Старобешевском водохранилище в летний период концентрация растворенного кислорода опускалась до 3,96 мг O₂/л, в то время как зимой не превышала 12 мг O₂/л, что соответствует нормальным значениям для пресноводных континентальных водоемов [15]. Анализ среднегодовых показателей (табл. 1) указывает на дефицит растворенного кислорода в Нижнекальмиусском водохранилище, что, вероятно, вызвано высокой концентрацией биогенов и, как следствие, массовым развитием цианобактерий, а также появлением заморов в следствии образования мортмассы.

Содержание биогенных элементов в водоемах имело достаточно неоднородную картину. Нижнекальмиусское водохранилище характеризовалось постоянно завышенными показателями по содержанию общего азота и фосфора. Максимальная концентрация биогенов наблюдалась в летний период, когда в отдельных заводях и мелководьях количество общего азота достигало 5,68 мг/л, а фосфора – 6,78 мг/л. Среднегодовые показатели варьировали от 2,56 ± 0,8 до 2,96 ± 0,7 мг/л для азота и от 4,26 ± 1,2 до 5,60 ± 0,9 мг/л для фосфора. Исходя из полученных данных по биогенным элементам, можно констатировать, что Нижнекальмиусское водохранилище относится к гиперэвтрофному типу. Это является результатом антропогенного эвтрофирования и приводит к «цветению» фитопланктона [15, 18].

Таблица 1

Среднегодовые значения гидрологических и гидрохимических параметров вод Старобешевского и Нижнекальмиусского водохранилищ

Год	Температура, °C	Содержание кислорода O ₂ , мг/л	Азот общий, мг/л	Фосфаты, мг/л	Хлорофилл <i>a</i> , мкг/л
<i>Нижнекальмиусское водохранилище</i>					
2019	17,63 ± 0,2	4,20 ± 0,3	2,82 ± 0,9	4,26 ± 1,2	97,11 ± 1,5
2020	18,11 ± 0,1	3,91 ± 0,5	2,56 ± 0,8	5,46 ± 0,8	102,78 ± 1,9
2021	21,04 ± 0,2	3,95 ± 0,4	2,70 ± 0,9	5,60 ± 0,9	106,47 ± 1,5
2022	21,01 ± 0,2	3,49 ± 0,2	2,96 ± 0,7	4,39 ± 0,4	79,14 ± 2,6
<i>Старобешевское водохранилище</i>					
2019	19,29 ± 0,1	8,83 ± 0,2	0,51 ± 0,7	2,02 ± 0,7	54,24 ± 1,4
2020	20,11 ± 0,2	9,14 ± 0,2	0,69 ± 0,9	2,15 ± 0,9	67,69 ± 1,3
2021	21,44 ± 0,2	8,87 ± 0,2	0,59 ± 0,8	2,23 ± 0,8	57,96 ± 1,3
2022	21,07 ± 0,2	8,95 ± 0,2	0,61 ± 0,7	2,22 ± 0,4	59,67 ± 1,2

Старобешевское водохранилище прилегает к ряду сельскохозяйственных территорий и подвергается прямому воздействию со стороны Старобешевской ТЭС. При этом наблюдаемые концентрации биогенных элементов находились в пределах предельно допустимых концентраций для пресных водоемов [15] (табл. 1).

Определение концентрации фотосинтетических пигментов проведено в корреляции с систематической структурой водорослей фитопланктона. Фитопланктон исследуемых водохранилищ бассейна реки Кальмиус по видовому составу имел следующую систематическую структуру (рис. 2).

Отдел Chlorophyta характеризовался как доминирующий по количеству видов, формируя 35,64% от общего количества видов. Отдел Heterokontophyta по встречаемости видов являлся субдоминантом, формирующим 31,58% от общего количества видов. Разнообразие видов отдела Cyanobacteria было значительно ниже – 18,69% от общего количества видов. Отделы Euglenophyta и Dinophlagellata суммарно формировали 14,09% от общего количества видов.

Количественные показатели фитопланктона в Нижнекальмиусском водохранилище определялись влиянием высокого антропогенного воздействия, т.к. водохранилище принимает практически все бытовые и промышленные стоки г. Донецка. Видовое разнообразие (по индексу Шенонна-Уивера) варьировало в пределах от 0,12 бит/экз. зимой, до 4,23 бит/экз. весной. Согласно индексу выравненности Пielу наиболее сложная структура фитопланктона была выявлена в мае 2019 г., она варьировала в широких пределах – от 0,01 бит/экз. до 0,68 бит/экз., что связано с высокой степенью вариабельности видового разнообразия фитопланктона. В Старобешевском водохранилище индекс Шенонна-Уивера варьировал от 0,86 бит/экз. зимой, до 3,96 бит/экз. осенью. Согласно индексу Пielу наиболее сложная структура фитопланктона выявлена в октябре

2021 г. Она варьировала в широких пределах – от 0,12 бит/экз. до 0,97 бит/экз.

Динамика количественных показателей численности фитопланктона исследуемых водохранилищ находилась в разнопиковом состоянии. Повышенные концентрации биогенных элементов в Нижнекальмиусском водохранилище свидетельствуют об антропогенном эвтрофировании, что выражается в ежегодном летнем «цветении» цианобактерий и приводит в состояние биотического неблагополучия водную экосистему Нижнекальмиусского водохранилища, провоцируя падение уровня кислорода и появление процессов замора. Содержание основного фотосинтетического пигмента хл *a* в Нижнекальмиусском водохранилище имело широкий диапазон варьирования. Зачастую в летний период концентрации хл *a* изменялась от 56 до 165 мкг/л, а диапазон наиболее часто встречаемых концентраций составлял от 60 до 90 мкг/л. Морфометрическое строение водохранилища, его протяженность и использование в народном хозяйстве характеризуют сложную гидрохимическую картину. Так, низкая скорость течения, небольшая глубина (до 4 м) формируют «бульон» из биогенных элементов и растворенного органического вещества. Весной и осенью состав фитопланктона имеет наиболее высокое разнообразие – так, мера разнообразия Шенонна-Уивера по динамике хл *a* варьировала от 0,5 бит/экз. до 3,71 бит/экз. При этом в летний период происходила стагнация биоразнообразия и максимальные концентрации хл *a* возрастали за счет монодоминантных групп цианобактерий. Стоит выделить тот факт, что в отдельных участках (заводы и мелководье) наблюдалась увеличение концентрации хл *a*, что является типичным для водоемов эвтрофного типа.

В Старобешевском водохранилище концентрация хл *a* изменялась в широких пределах. Диапазон часто встречаемых значений варьировал от 12 до 78 мкг/л. Вследствие отсутствия ледостава в зимний период наблюдалось ранне-сезонное увеличе-

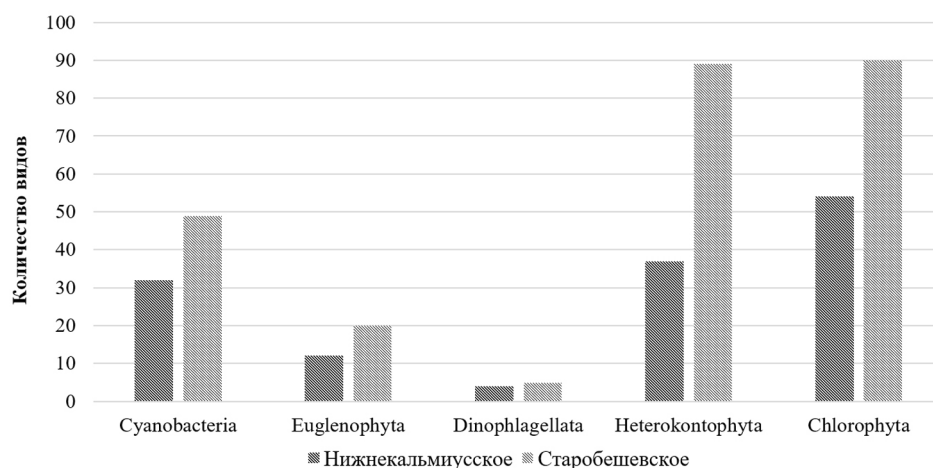


Рис. 2. Количество видов доминирующих отделов фитопланктона в Нижнекальмиусском и Старобешевском водохранилищах.

ние концентрации хл *a*. Так, в марте 2021 г. концентрация хл *a* достигала значений 23 мкг/л. Ранний прогрев влечет за собой увеличенное биоразнообразие фитопланктона. Весной мера разнообразия Шенонна-Уивера по динамике хл *a* варьировала в диапазоне от 2,5 бит/экз. до 4,12 бит/экз., что и является пиковым значением в сезонном разнообразии фитопланктона. В летний период сохраняются высокая концентрация биогенных элементов и большой диапазон концентраций хл *a*. Максимальное значение определено для заводей, поросших сплошными зарослями рдеста и рогоза от 11 до 57 мкг/л. Стоит выделить, что в приплотинном участке Старобешевского водохранилища наблюдается замедленный водообмен. Это определяет увеличение концентрации хл *a* в среднем на 5–8 мкг/л. Осенний период характеризовался понижением концентрации хл *a* до 14–28 мкг/л. Следовательно, Старобешевское водохранилище имеет концентрации хлорофилла *a* в 2–5 раз ниже, чем Нижнекальмиусское водохранилище, что определяет его как водохранилище олиготрофного типа.

На фоне широкой вариабельности концентрации хл *a* дополнительные пигменты дают важную

информацию для более глубокого понимания особенностей функционирования водных экосистем. Содержание концентрации хл *b* изменялась в диапазоне от 2 до 45 мкг, что в 6–10 раз меньше содержания основного пигмента, коэффициент вариации составлял 32–37% в Старобешевском водохранилище. В Нижнекальмиусском водохранилище, несмотря на пиковые значения хл *a*, показатели дополнительных пигментов характеризуются средней степенью изменчивости. Концентрации хл *b* и хл *c* превышают концентрацию основного пигмента на 19–78%. Превышение концентраций хл *b* и хл *c* над показателями хл *a* вероятнее всего связаны с высокой численностью зеленых водорослей, золотистых водорослей рода *Dinobryon* и динофлагеллят рода *Ceratium*. Феопигменты (продукты распада хлорофилла) в пиковые периоды «цветения» фитопланктона варьировались в диапазоне 2,5–7,3 мкг, что ниже по отношению к хл *a*, что вероятно отражало высокую степень изменчивости количественных показателей фитопланктона. С уменьшением «цветения» фитопланктона. В первой декаде лета и осени наблюдалось увеличение концентрации феопигментов.

Таблица 2

Сезонные изменения содержания фотосинтетических пигментов водорослей в водоемах водохранилищ реки Кальмиус (2021 г.)

Точка отбора	Месяц	Хлорофилл мкг/л			Феопигменты	Каротиноиды	Пигментный индекс (440/664)
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			
НК	V	$\frac{165,3 \pm 4,2}{27,3}$	$\frac{27,2 \pm 0,8}{32,1}$	$\frac{11,5 \pm 0,9}{41,9}$	$\frac{64,8 \pm 8,3}{69,7}$	$\frac{48,2 \pm 0,2}{83,2}$	$\frac{2,3 \pm 0,9}{25,9}$
	VII	$\frac{155 \pm 1,1}{39,3}$	$\frac{25,8 \pm 0,9}{31,3}$	$\frac{14,3 \pm 1,2}{18,3}$	$\frac{21,6 \pm 1,2}{45,7}$	$\frac{28,1 \pm 14,3}{68,1}$	$\frac{2,6 \pm 0,9}{53,8}$
	IX	$\frac{114,1 \pm 1,9}{57,12}$	$\frac{17,9 \pm 1,5}{37,9}$	$\frac{1,4 \pm 1,6}{39,2}$	$\frac{31,6 \pm 1,2}{44,2}$	$\frac{160,3 \pm 0,3}{4,6}$	$\frac{4,6 \pm 0,7}{52,2}$
СТ	V	$\frac{48,2 \pm 2,1}{33,3}$	$\frac{11,0 \pm 0,5}{22,1}$	$\frac{6,1 \pm 0,9}{12,2}$	$\frac{5,9 \pm 1,6}{19,3}$	$\frac{53,6 \pm 0,9}{72,1}$	$\frac{9,5 \pm 5,6}{127,2}$
	VII	$\frac{51,1 \pm 0,9}{2,1}$	$\frac{15,9 \pm 0,7}{18,7}$	$\frac{5,4 \pm 1,3}{11,1}$	$\frac{5,2 \pm 1,6}{41,6}$	$\frac{13,6 \pm 0,7}{48,3}$	$\frac{10,8 \pm 10,3}{120,3}$
	IX	$\frac{57,2 \pm 2,6}{12,9}$	$\frac{13,9 \pm 1,9}{39,9}$	$\frac{8,9 \pm 1,4}{12,1}$	$\frac{5,6 \pm 0,9}{17,6}$	$\frac{9,6 \pm 0,8}{42,6}$	$\frac{10,6 \pm 15,6}{92,6}$

Примечание: Над чертой – показатели со стандартной ошибкой, под чертой – коэффициент вариации. НК – Нижнекальмиусское водохранилище, СТ – Старобешевское водохранилище.

Таблица 3

Коэффициенты корреляции содержания хлорофилла *a* с содержанием других пигментов в водохранилищах бассейна реки Кальмиус (июнь–август 2021 г.)

Точка отбора*	<i>p</i> -0,05**	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофилл <i>c</i>	Феофитин	Каротиноиды	Пигментный индекс
НК1	0,168	0,982	0,573	0,709	0,919	0,083
НК2	0,215	0,734	0,620	0,953	0,523	0,510
НК3	0,171	0,768	0,078	0,842	0,546	0,889
СТ1	0,116	0,347	0,032	0,199	0,985	0,357
СТ2	0,187	0,655	0,509	0,735	0,530	0,002
СТ3	0,196	0,857	0,653	0,016	0,496	0,880

Примечание: *НК – Нижнекальмиусское водохранилище, СТ – Старобешевское водохранилище. ** статистически значимое отличие от контроля, *p* < 0,05 – статистически достоверные (значимые) различия.

Следовательно, определение динамики фео-пигментов, как продуктов распада хлорофилла, позволило охарактеризовать процессы деградации органического вещества и оценить интенсивность изменений в составе фитопланктона. В свою очередь, анализ концентраций каротиноидов предоставил возможность выявить особенности фотосинтетической активности и установить доминирующие группы водорослей в периоды «цветения». Превышение значений содержания каротиноидов над концентрацией хл *a* в августе на 71% свидетельствовал о превышении деструкции органического вещества над ассимиляцией. Максимальные концентрации каротиноидов регистрировались в периоды интенсивного «цветения» монодоминантных групп цианобактерий.

Заключение

Содержание хл *a* в исследуемый период изменялась в диапазоне от 12 до 165 мкг/л. Наиболее высокие значения показателей наблюдались в летний период в Нижнекальмиусском водохранилище вследствие «цветения» цианобактерий. Увеличение концентрации хл *a* вероятнее всего связано с увеличением количественных показателей биогенных элементов. Старобешевское водохранилище имело широкую вариабельность хл *a*, что подтверждается наличием нескольких пиков кон-

центраций. В зимний период вследствие притока теплых вод концентрация хл *a* составляла до 14 мкг/л. Межгодовые изменения хл *a*, по-видимому, зависят в большей степени от климатических факторов. Ежегодное увеличение температуры приводит к удлинению периода максимальных концентраций хл *a*.

Следовательно, водные экосистемы водохранилищ имеют разную реакцию на внешние факторы. Нижнекальмиусское водохранилище имеет эвтрофный статус, который ежегодно поддерживается увеличенными концентрациями биогенных элементов путем формирования монодоминантных групп автотрофов. Экосистема Старобешевского водохранилища регулируется температурным фактором, в следствии которого происходит поддержание мезотрофного статуса при увеличенных показателях биоразнообразия.

Исследование выполнено в рамках молодежной лаборатории «Диагностика и механизмы адаптации природных и антропогенно-трансформированных экосистем Донбасса» (№ госрегистрации НИОКТР 1023110700153-4-1.6.19;1.6.11;1.6.12). Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мирненко Э.И. Диатомовый анализ водохранилищ, расположенных на р.Кальмиус. *Самарский научный вестник*. 2023;12(1):82–86.
2. Мирненко Э.И., Макуха А.О. Экологическое состояние прудов г. Донецка по содержанию органического вещества. *Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона*. 2021;(1–2):17–22.
3. Safonov A. Indicator plants of anthropogenic disturbances: Scientific approach, educational technologies. *E3S Web of Conferences*. 2023;431:e01031.
4. Mineeva N.M. Composition and content of photosynthetic pigments in plankton of the Volga River reservoirs (2015–2016). *Transactions of Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS*. 2018;81(84):85–96.
5. Минеева Н.М. *Растительные пигменты в воде волжских водохранилищ*. М.: Наука; 2004. 156 с.
6. Gregor J. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll *a*: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Res.* 2004;38(3):517–522.
7. Мирненко Э.И. Минерализация водных экосистем как фактор трансформации комплексов фитопланктона прудов г. Донецка. *Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона*. 2021;(3–4):30–35.
8. Авраимова Т.В., Сафонов А.И. Экологические разработки в Донбассе: библиографический учет и популяризация научных исследований. *Научные и технические библиотеки*. 2023;(3):30–42.
9. Сафонов А.И., Глухов А.З. Фитомониторинг в техногенно трансформированной среде: методология и практика. *Экосистемы*. 2021;(28):16–28.
10. Mirnenko E.I. Taxonomic diversity of phytoplankton of the Kalmius River and its reservoirs. *Ecosystem Transformation*. 2022;5(2):63–73.
11. Кузьменко Л.В., Сидько А.Ф., Васильев В.А. Сравнение содержания хлорофилла, измеренного стандартным спектрофотометрическим и безэкстрактным методами в приэкваториальной зоне Индийского океана. *Экология моря*. 1990;34:8–15.
12. Ефимова Т.В., Чурилова Т.Я., Скороход Е.Ю., Моисеева Н.А., Землянская Е.А. Вертикальное распределение биооптических показателей вод Азово-Черноморского бассейна в апреле – мае 2019 года. *Морской гидрофизический журнал*. 2020;36(5(215)):571–581.
13. Минеева Н.М. Мухутдинов В.Ф. Сравнительная оценка содержания хлорофилла в водохранилищах Верхней Волги по данным спектрофотометрического и флуоресцентного методов. *Вода: химия и экология*. 2017;(4):3–9.
14. Inyang A.I., Wang Y.-S. Phytoplankton diversity and community responses to physicochemical variables in mangrove zones of Guangzhou province. *Ecotoxicology*. 2020;29(6):650–668.
15. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности. М.: Протектор; 2000. 848 с.
16. *Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений*. Под ред. А. В. Абакумова. Л.: Гидрометеиздат; 1983. 239 с.
17. Algaebase.org [Электронный ресурс] URL: <https://www.algaebase.org/> (дата обращения: 11.09.2024).

18. Логинов В.В., Баянов Н.Г., Кривдина Т.В. Сезонная динамика хлорофилла а и каротиноидов оз. Светлояр и его трофический статус. *Вода: химия и экология*. 2012;11(53):60–66.

19. Эдельштейн, К.К. Даценко Ю.С., Пуклаков В.В. Цветение водохранилища многолетнего регулирования стока. *Водные ресурсы*. 2021;48(2):164–172.

20. Сафонов А.И. *Экологический фитомониторинг антропогенных трансформаций*. Донецк.: Изд-во ЭДИТ; 2024. 289 с.

21. Маркевич А.В., Ветрова Е.В. Сезонная динамика и пространственное распределение химических показателей воды Верхне-Кальмиусского водохранилища. *Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона*. 2009;1(9):194–201.

Поступила в редакцию 12.04.2024

После доработки 17.11.2024

Принята в печать 26.12.2024

RESEARCH ARTICLE

Content composition and dynamics of photosynthetic pigments in the reservoirs of the Kalmius River of the Donetsk People's Republic

E.I. Mirnenko 

*Department of Botany and Ecology, Donetsk State University, Shchorsa, 46, Donetsk, 283001, Russia
e-mail: eduard_mirnenko@list.ru*

The paper presents data on the content, composition, and interannual and seasonal dynamics of photosynthetic pigments in the Nizhnekalmius and Starobeshevo reservoirs of the Kalmius River in the Donetsk People's Republic. The average chlorophyll a content in the reservoirs ranged from 54.24 ± 1.4 to 106.47 ± 1.5 $\mu\text{g/litre}$. The Nizhnekalmius reservoir was characterised by higher values of photosynthetic pigment concentration with lower phytoplankton biodiversity. The presence of a constant dominant group and increased concentrations of nutrients characterise the reservoir ecosystem as unstable. The summer bloom of cyanobacteria determines high chlorophyll a concentrations. The increase in the absolute and relative number of cyanobacteria indicates the transition to the eutrophic type of the reservoir. The Starobeshevo reservoir was characterised by a wide variability of chlorophyll a values with no single peak character of phytoplankton development. Interannual changes in chlorophyll a depend indirectly on the temperature factor and largely on the variation of concentrations and biogenic elements. The annual increase in temperature leads to a prolongation of the period of maximum chlorophyll a concentrations. In general, the ecosystem of the Starobeshevo and Nizhnekalmius reservoirs is coping with anthropogenic impacts.

Keywords: *photosynthetic pigments, chlorophyll a, phytoplankton, reservoirs, ecosystem, Donbass*

Funding: The task has been completed within the framework of the youth laboratory “Diagnostics and mechanisms of adaptation of natural and anthropogenically transformed ecosystems of Donbass” (№ 1023110700153-4-1.6.19;1.6.11;1.6.12).

Сведения об авторе

Мирненко Эдуард Игоревич — ст. преп. кафедры ботаники и экологии биологического факультета ДонГУ. Тел.: 8-856-302-06-00; e-mail: eduard_mirnenko@list.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3625-5326>



Некоторые физико-химические характеристики мареннин-подобного пигмента, синтезируемого морской диатомовой водорослью *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta)

Н.А. Давидович^{*} , Е.С. Кириенко

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

^{*}e-mail: nickolaid@yandex.ru

Мареннин и мареннин-подобные пигменты, продуцируемые некоторыми представителями диатомовых водорослей рода *Haslea*, представляют собой уникальные водорастворимые соединения, обладающие рядом ценных свойств. Химическая структура пигментов этой группы до сих пор не раскрыта. Данные о физико-химических характеристиках мареннина получены преимущественно для одного вида — *H. ostrearia*. За последние полтора десятилетия описаны четыре новых мареннин-продуцирующих вида, что открывает перспективу изучения биоразнообразия рода *Haslea* и соответственно разнообразия мареннинов. Мареннин-продуцирующие представители диатомовых рода *Haslea* накапливают пигмент в апикальных концах клеток, а также выделяют его во внешнюю среду, благодаря чему она приобретает зеленовато-синий цвет. Роль мареннина в функционировании клеток диатомовых неизвестна, но можно допустить, что пигмент, не участвующий в фотосинтезе и поглощающий свет преимущественно в ультрафиолетовой, фиолетовой и красной областях, является фотопротектором. Химический состав и спектральные характеристики мареннинов, продуцируемых разными видами *Haslea*, слегка различаются. В то время как у некоторых видов, особенно у *H. ostrearia*, физико-химические свойства мареннина описаны достаточно обстоятельно, пигмент *H. karadagensis* — эндемика Черного моря — остается практически неисследованным. В работе представлены в сравнении характерные для заданных условий спектрофотометрические и физико-химические показатели мареннинов *H. karadagensis* и *H. ostrearia*. Определены значения кажущихся констант диссоциации и изобестических точек для мареннинов обеих диатомей.

Ключевые слова: диатомовые, *Haslea karadagensis*, мареннин, пигмент, спектрофотометрия, изобестические точки, кажущиеся константы диссоциации

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-2

Введение

Диатомовая водоросль *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget относится к мареннин-продуцирующим видам рода *Haslea* Simonsen. Эта водоросль является эндемиком Черного моря, впервые была обнаружена у берегов Каратага, благодаря чему и получила свое название [1]. Близкородственный вид *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen — космополит, встречается во многих морях Мирового океана, отмечен также в прибрежной части Черного моря [2].

Мареннин существует в двух формах — внутриклеточной и внеклеточной. Внутриклеточный

мареннин накапливается в апикальных областях клеток, внеклеточный мареннин прижизненно выделяется клетками во внешнюю среду. Две формы мареннина имеют разные молекулярные массы и спектральные характеристики [3]. Обе формы очищенного мареннина у *H. karadagensis* и *H. ostrearia* проявляли антиоксидантную, противовирусную и противогрибковую активность [4–6]. У водных неочищенных экстрактов мареннина *H. ostrearia* наблюдалась антипролиферативная, противоопухолевая и антикоагулянтная активность [7, 8]. Обе формы мареннина *H. ostrearia* ингибируют рост и развитие патогенных бактерий,

поражающих устриц [5, 9]. Эксперименты по окрашиванию моллюсков-фильтраторов с использованием мареннинов *H. karadagensis* и *H. ostrearia* показали, что благодаря мареннину тело моллюсков приобретает зеленоватый цвет [6, 10] – свойство, издавна используемое в аквакультуре устриц.

Было предложено несколько иногда противоречивых гипотез, касающихся химической природы пигмента и хромофоров, определяющих его сине-зеленый цвет. В структуре мареннина *H. ostrearia* обнаружены моносахариды, такие как: галактоза, ксилоза, манноза, рамноза и фукоза [11]. Также установлено, что этот пигмент содержит в своей структуре 1,3-β-глюкан [12]. Роберт и Халлет [13], основываясь на микроспектрофотометрическом анализе *in vivo*, сообщили, что пигмент очень похож на с-фикоцианин, в то время как Бокат [14] предположил, что мареннин является хромопротеином, совершенно отличным от фикоцианина. Рэнсон [15] считал, что простетическая группа пигмента может быть каротиноидом. По мнению Бахраха [16], Моро [17] и Женев с соавт. [18] синий пигмент был продуктом распада хлорофилла, чему противоречат наблюдения Тремблина и Робера [19], которые не обнаружили никаких изменений в количестве хлорофилла в связи с производством мареннина. Нейвилль и Даст [20] связали мареннин с антоцианами. Хардуэн и др. [21] описали мареннин как смесь нескольких макромолекул. Фенольную природу хромофора мареннина предположили Пувро с соавт. [3]. По мнению Франсесон и др. [22] цвет пигмента обусловлен наличием системы хинонов и фенильных колец. Наконец, данные исследований Зебири и др. [11], основанные на изучении спектров ядерного магнитного резонанса, свидетельствуют о том, что мареннин – это гетерополисахарид с высокой степенью ветвления, при этом не было обнаружено никаких конкретных признаков потенциального хромофора.

Мареннин не выполняет светособирающей функции и, скорее всего, является фотопротектором, экранирующим избыток света [23]. Он характеризуется наличием относительно широких полос поглощения в УФ-видимом диапазоне, а также в красной области [3, 15]. Давно было замечено, что спектральные характеристики мареннина в зависимости от pH изменяют свой цвет от фиолетового и синего в кислой среде до желто-зеленого в щелочной [10, 22]. Соответственно изменяются спектры поглощения пигментов, и для них можно определить изобестические точки [3]. Положение изобестических точек является важной характеристикой пигмента. Для хорошо изученной *H. ostrearia* установлены характерные изобестические точки для внутри- и внеклеточной форм пигмента, для *H. karadagensis* такие данные отсутствуют.

Еще одной важной характеристикой мареннинов служит кажущаяся константа диссоциа-

ции, значение которой можно найти по спектрам поглощения, полученным для разных значений pH. Так же, как и в случае с изобестическими точками, значения кажущихся констант диссоциации были установлены только для мареннина *H. ostrearia* [3].

Цель нашей работы состояла в том, чтобы определить значения ранее неизученных физико-химических характеристик мареннина *H. karadagensis*, что позволит оценить разнообразие мареннинов и ближе подойти к раскрытию природы этого уникального пигмента.

Материалы и методы

Определение физико-химических свойств было проведено на нативном внеклеточном мареннине, накапливаемом в клонных культурах *H. karadagensis* и *H. ostrearia*, находившихся в экспоненциальной фазе роста. Штаммы *H. karadagensis* были выделены из бентосных проб, отобранных в прибрежной части Карадагского природного заповедника в ноябре 2022 г., и содержались в специально оборудованном помещении с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ при естественном рассеянном освещении. Клонные культуры *H. ostrearia*, являющиеся потомками клонов, выделенных с атлантического побережья Франции, были взяты из Коллекции диатомовых водорослей Мирового океана (Карадагская научная станция, Институт биологии Южных морей РАН, <https://ibss-ras.ru/about-ibss/structure-ibss/tsentry-kollektivnogo-polzovaniya/collection-of-diatoms-of-world-ocean/>). Альгологически чистые культуры содержали в колбах Эрленмейера объемом 50 мл в модифицированной среде ESAW [24] с уровнями солености 20‰ для черноморской *H. karadagensis* и 36‰ для океанической *H. ostrearia*. Продолжительность культивирования *H. karadagensis* и *H. ostrearia*, достаточная для получения необходимой для исследования концентрации внеклеточного мареннина, составляла 10 сут, в течение которых культуры находились в экспоненциальной фазе роста. В этой фазе накопление внеклеточного пигмента в среде происходит за счет прижизненного выделения клетками. Внутриклеточный мареннин остается внутри клеток. Влияние компонентов среды, которые могли бы изменить спектры поглощения пигментов, не учитывалось.

Отметим, что мареннином принято называть пигмент, синтезируемый *H. ostrearia*, в то время как пигменты у других видов *Haslea* считают мареннин-подобными ввиду наблюдающихся небольших различий [25]. В дальнейшем изложении мы будем использовать обобщающий термин «мареннин».

Для спектрального анализа взятые из культур клонов *H. karadagensis* и *H. ostrearia* среды профильтровывали через бумажные плотные, узкопористые фильтры медленной фильтрации (Filtrak,

ГДР). Растворы помещали в стеклянные кюветы с длиной оптического пути 50 мм. Регистрацию спектров в диапазоне длин волн от 400 до 900 нм производили, используя спектрофотометр ПромЭкоЛаб ПЭ-5400УФ (Shanghai Mapada Instruments Co, Ltd., Китай) и прилагаемое к нему программное обеспечение Scan54. Выполнено шесть серий экспериментов для *H. karadagensis* и четыре серии для *H. ostrearia*.

Используемая нами искусственная морская вода (модифицированная среда ESAW), обладающая буферными свойствами, имела pH = 8,25. Для получения спектров поглощения при разных значениях pH исходный раствор внеклеточного мареннина подкисляли концентрированной соляной кислотой. Значения pH измеряли с помощью pH-метра pH-150МИ (ООО НПО «Измерительная техника ИТ», Россия). Температура в процессе измерений не изменялась и составляла 20°C.

Результаты

На основании полученных спектров поглощения для внеклеточной формы мареннинов *H. karadagensis* и *H. ostrearia* установлено положение изобестических точек и диапазоны длин волн, в которых изменялось положение максимумов поглощения при изменении pH. Для каждой серии экспериментов для 7–11 длин волн построены графики зависимости поглощения света от уровня pH. Аппроксимация выполнена полиномом четвертой степени. Графическим методом [26] определены значения кажущейся константы диссоциации. Рассчитаны средние значения константы диссоциации для каждой серии и общие средние.

В диапазоне длин волн от 400 до 900 нм раствор внеклеточного мареннина *H. karadagensis* и *H. ostrearia* имел один максимум поглощения, положение которого изменялось при различных показателях pH (рис. 1 А, Б). В нативном состоянии (pH среды 8,25) максимум поглощения пигмента соответствовал длине волны 663–665 нм у обоих видов. При подкислении раствора (вплоть до pH = 4,8–5,0) положение максимума не изменялось. Дальнейшее подкисление приводило к резкому переходу максимума в синюю область (гипсохромный сдвиг) и при значениях pH меньше 2,5–3,0 его положение (562–567 нм) опять становилось практически неизменным (рис. 1 В, Г).

По спектрам поглощения, полученным для разных значений pH, можно определить две изобестические точки. Для внеклеточного мареннина *H. karadagensis* (рис. 1 А) одна изобестическая точка находилась вблизи 614 нм, другая вблизи 507 нм. Для внеклеточной формы пигмента *H. ostrearia* (рис. 1 Б) одна изобестическая точка располагалась в области 612 нм, другая в области 516 нм. Для обоих видов следует отметить относительно широкий диапазон разброса точек пересечения спектров, составлявший порядка 20 нм.

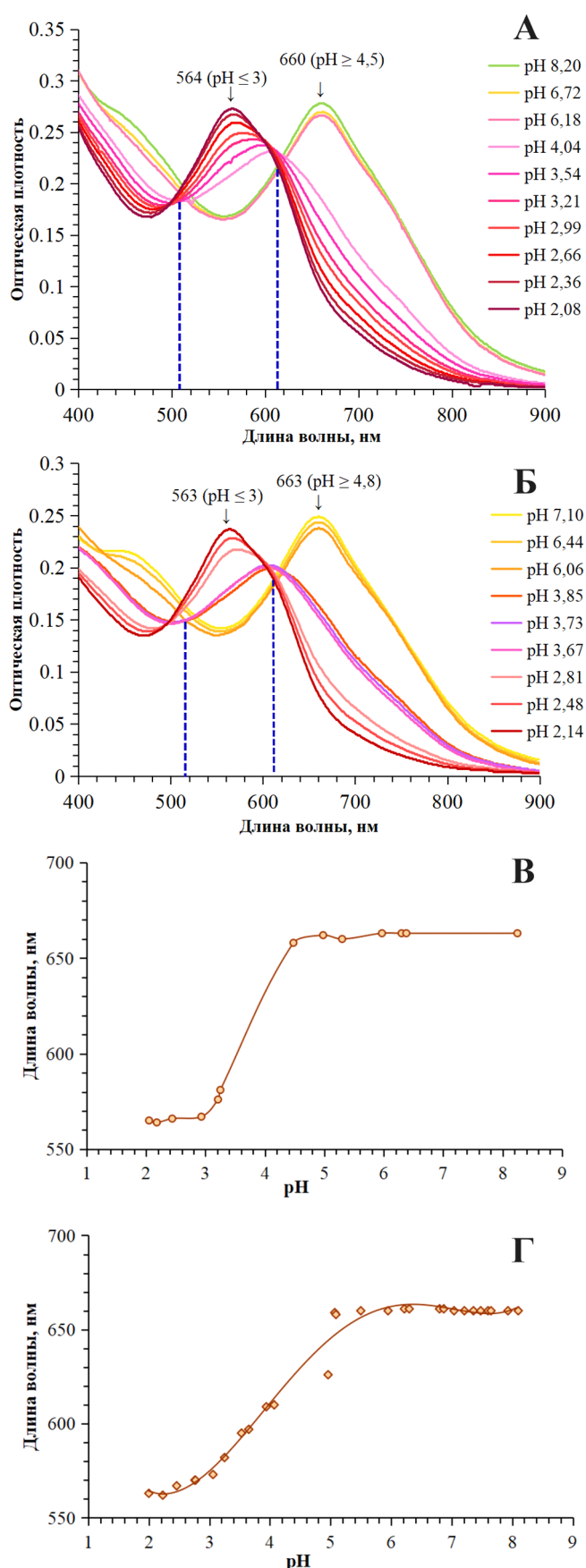


Рис. 1. Спектры поглощения внеклеточного мареннина *Haslea karadagensis* (А) и *H. ostrearia* (Б) и положение максимумов абсорбции у *H. karadagensis* (В) и *H. ostrearia* (Г) при разных значениях pH. Штриховыми линиями показано расположение изобестических точек

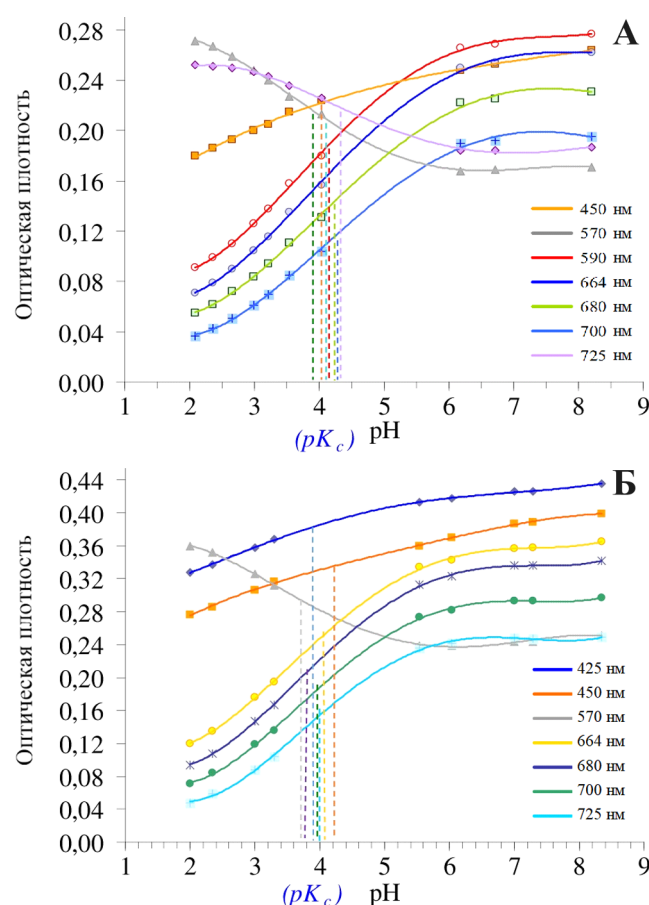


Рис. 2. Изменение поглощения раствора внеклеточного мареннина *Haslea karadagensis* (А) и *H. ostrearia* (Б) на нескольких длинах волн в зависимости от pH. Штриховые линии, соответствующие точкам перегиба кривых, обозначают положение кажущейся константы диссоциации (pK_c)

Полученные спектрофотометрические данные позволили установить кажущиеся константы диссоциации мареннина для изученных видов (рис. 2). Для *H. karadagensis* и *H. ostrearia* средние значения кажущихся констант диссоциации и доверительные интервалы для них (при уровнях значимости 95%) составили $4,02 \pm 0,21$ ($n = 6$) и $3,83 \pm 0,13$ ($n = 4$) pH соответственно. Дисперсионный анализ (тест ANOVA в программе Origin Pro 9) показал отсутствие статистически значимых различий между двумя средними.

Обсуждение

Изобестические точки характеризуют оптические свойства пигментов, их наличие говорит о том, что хромофорные группы могут находиться в двух альтернативных состояниях в зависимости от pH среды. Ранее было установлено положение изобестических точек внеклеточного мареннина *H. ostrearia*, которое соответствовало длинам волн 490 и 635 нм [3]. В условиях наших экспериментов получены иные средние значения изобестических точек для мареннина *H. ostrearia*, которые находи-

лись вблизи 516 и 612 нм. Такое расхождение в положении изобестических точек может объясняться разными причинами — в частности, отличающимися условиями экспериментов и тем, что в наших экспериментах использован не экстрагированный и очищенный мареннин, а мареннин в его нативном состоянии. При всем различии условий экспериментов полученные нами данные для мареннина *H. ostrearia* могут служить «реперной точкой» для сравнения с данными, полученными для *H. karadagensis*.

Положения изобестических точек, установленные нами для *H. karadagensis* и *H. ostrearia*, в оранжевой области спектра практически совпадали, в то время как в зеленой области изобестическая точка у *H. karadagensis* была смещена в сторону коротких волн приблизительно на 9 нм.

Пока остается открытым вопрос относительно пути формирования внеклеточного мареннина [3]. Потенциально возможны два способа: (1) высвобождение внутриклеточного мареннина в культуральную среду в связи с гибелью клеток при их длительном культивировании с последующим превращением во внеклеточную форму и (2) прижизненное выделение пигмента в форме внеклеточного мареннина как продукта метаболизма. Внутриклеточный мареннин, выделившийся в среду, но не претерпевший трансформации во внеклеточную форму, может повлиять на получаемые спектры поглощения, поскольку молекулярная масса и оптические свойства двух форм пигмента различны. Например, внутриклеточный мареннин *H. ostrearia* имеет только одну явно выраженную изобестическую точку, соответствующую длине волны 650 нм [3]. Небезынтересно отметить, что в случае с *Haslea provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget у обеих форм пигмента (внутри- и внеклеточной) наблюдалась единственная изобестическая точка, соответствующая 640 нм [27]. Другие водорастворимые метаболиты водорослей также могут иметь полосы поглощения, которые искажают спектры поглощения самого мареннина [15, 28, 29].

В отличие от изобестических точек, полученные нами значения кажущейся константы диссоциации для внеклеточного мареннина *H. ostrearia* ($3,83 \pm 0,13$) оказались вполне сопоставимыми с литературными данными ($4,02 \pm 0,02$) [3]. Точно такое же значение ($4,02 \pm 0,10$) мы получили для кажущейся константы диссоциации внеклеточного мареннина *H. karadagensis*. Это второе значение, полученное для мареннин-продуцирующих видов.

В целом, мареннин-продуцирующие виды рода *Haslea* демонстрируют схожие положения пиков в спектрах поглощения (таблица). При этом у нативного (без подкисления) внеклеточного мареннина *H. nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti отсутствовало плечо в области 430–470 нм [30], которое явно прослеживалось у *H. ostrearia* [15] и было хорошо выражено у наших клонов *H. karadagensis*.

Таблица

Положение пиков поглощения и изобестических точек для внутри- и внеклеточных форм мареннина у представителей рода *Haslea*

Вид	Пики поглощения мареннина* в видимой области спектра, нм		Изобестические точки для мареннинов, нм		Источник
	внутриклеточного	внеклеточного	внутриклеточного	внеклеточного	
<i>H. ostrearia</i>	623	460–466, 663	–	–	[28]
	672	677	650	490, 635	[3]
	672	677	–	–	[29]
	–	663–665	–	516, 612	Наши данные
<i>H. karadagensis</i>	–	663–665	–	507, 614	Наши данные
<i>H. provincialis</i>	570 (pH = 2), 670 (pH = 12)	570 (pH = 2), 670 (pH = 12)	640	640	[27]
<i>H. nusantara</i>	–	663	–	–	[30]
<i>H. silbo</i>	–	–	640	640	[31]

Примечание: * – для нативного состояния мареннина при pH, близком к 8,2

Как уже выше упоминалось, существенные межвидовые различия могут наблюдаться в положении и количестве изобестических точек. Показано, что *H. provincialis* филогенетически близка к *H. karadagensis* и *H. ostrearia* [30], однако наличие только одной изобестической точки, расположенной на длине 640 нм, определяет наибольшее сходство пигментов *H. provincialis* и *H. silbo* Gastineau, Hansen & Mouget [31].

Таким образом, положение пика поглощения в красной области спектра для внеклеточной формы мареннина у *H. karadagensis* совпадало с положением пиков у других мареннин-продуцирующих представителей рода *Haslea*, при этом отмечены некоторые межвидовые различия в положении и количестве изобестических точек. С учетом условий, заданных в экспериментах, различие физико-химических характеристик пигментов может служить дополнительным критерием для разграничения видов.

До настоящего времени структура молекул мареннина остается неизвестной, несмотря на

более чем столетний период его изучения [3, 11]. Это также относится к хромофору. Какова бы ни была его природа – полифенольная [3], отчасти полисахаридная [11] или другого типа – вполне возможно, что он составляет лишь небольшую часть молекулы [25]. Возможно, именно сложность структуры молекулы мареннина породила большое количество предположений о природе пока неизвестного для данного вещества хромофора.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №24-24-00054). В работе были использованы материалы Научно-образовательного центра коллективного пользования Института биологии южных морей имени А.О. Ковалевского «Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана». Работа выполнена без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gastineau R., Davidovich N.A., Bardeau J.-F., Caruso A., Leignel V., Hardivillier Y., Jacquette B., Davidovich O.I., Rincé Y., Gaudin P., Cox E.J., Mouget J.-L. *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta): a second blue diatom, recorded from the Black Sea and producing a novel blue pigment. *Eur. J. Phycol.* 2012;47(4):469–479.

2. Неврова Е.Л. *Разнообразие и структура таксонов бентосных диатомовых водорослей (Bacillariophyta) Черного моря*. Севастополь: ФИЦ ИнБЮМ; 2022. 329 с.

3. Pouvreau J.-B., Morançais M., Fleury F., Rosa F., Thion L., Cahingt B., Zal F., Fleurence J., Pondaven P. Preliminary characterisation of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Appl. Phycol.* 2006;18(6):757–767.

4. Pouvreau J.-B., Housson E., Tallec L., Morançais M., Rincé Y., Fleurence J., Pondaven, P. Growth inhibition of several marine diatom species induced by the shading effect and allelopathic activity of marennine, a blue-green polyphenolic pigment of the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2007;352(1):212–225.

5. Gastineau R., Pouvreau J.-B., Hellio C., Morançais M., Fleurence J., Gaudin P., Bourgougnon N., Mouget J.-L. Biological activities of purified marennine, the blue pigment produced by the diatom *Haslea ostrearia* and responsible for the greening of oysters. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60(14):3599–3605.
6. Gastineau R., Hardivillier Y., Leignel V., Tekaya N., Morançais M., Fleurence J., Davidovich N.A., Jacquette B., Gaudin P., Hellio C., Bourgougnon N., Mouget J.-L. Greening effect on oysters and biological activities of the blue pigments produced by the diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquac.* 2012;368–369:61–67.
7. Carbonnelle D., Pondaven P., Morançais M., Massé G., Bosch S., Jacquot C., Briand G., Robert J.-M., Roussakis C. Antitumor and antiproliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen against solid tumors: lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer Res.* 1999;19(1A):621–624.
8. Bergé J.-P., Bourgougnon N., Alban S., Pojer F., Billaudel S., Chermann J.-C., Robert J.-M., Franz G. Antiviral and anticoagulant activities of a water-soluble fraction of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Planta Med.* 1999;65:604–609.
9. Turcotte F., Mouget J.-L., Genard B., Lemarchand K., Deschênes J.S., Tremblay R. Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* supernatant culture containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. *Aquat. Liv. Res.* 2016;29(4):401.
10. Gastineau R., Prasetya F.S., Falaise C., Cognie B., Decottignies P., Morançais M., Méléder V., Davidovich N.A., Turcotte F., Tremblay R., Pasetto P., Dittmer J., Bardeau J.-F., Pouvreau J.-B., Mouget J.-L. Marennine-Like Pigments: Blue Diatom or Green Oyster Cult? *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, vol. 2. Eds. B. Stéphane and S.S. Bates. Weinheim: Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2018:529–551.
11. Zebiri I., Jacquette B., Francezon N., Herbaut M., Latigui A., Bricaud S., Tremblay R., Pasetto P., Mouget J.-L., Dittmer J. The polysaccharidic nature of the skeleton of marennine as determined by NMR spectroscopy. *Mar. Drugs.* 2023;21(1):42.
12. Yusuf M., Baroroh U., Nuwarda R.F., Prasetya F.S., Ishmayana S., Novianti M.T., Tohari T.R., Hardianto A. Sub-rotto T., Mouget J.-L., Pasetto P. Theoretical and experimental studies on the evidence of 1,3- β -glucan in marennine of *Haslea ostrearia*. *Molecules.* 2023;28(15):5625.
13. Robert J.-M., Hallet J.-N. Absorption spectrum *in vivo* of the blue pigment ‘marennine’ of the pennate diatom *Navicula ostrearia* Bory. *J. Exp. Bot.* 1981;32(127):341–345.
14. Bocat L. Sur la marennine de la diatomée bleue; comparaison avec la phycocyanine. *C. R. Soc. Biol.* 1907;62:1073–1075.
15. Ranson G. Le verdissement des huîtres. *Sciences.* 1937;8(5):13–24.
16. Bachrach E. Le bleuissement des diatomées et le verdissement des huîtres. *Rev. Trav. Inst. Pêches Mar.* 1935;8:112–123.
17. Moreau J. Contribution aux recherches écologiques sur les claires à huîtres du bassin de Marennes-Oléron. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 1970;34:381–462.
18. Genevès, L., Choussy M., Barbier M., Neuville D., Daste P. Ultrastructure et composition pigmentaire comparées des chromatophores de la Diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory normale et bleue. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1976;282 (D):449–452.
19. Tremblin G., Robert J.M. Carbon fixation by the peculiar marine diatom *Haslea ostrearia*. *Photosynthetica.* 2001;39(2):215–220.
20. Neuville D., Daste P. Production de pigment bleu par la diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory maintenue en culture uni-algale sur un milieu synthétique carencé en azote nitrique. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1972;274:2030–2033.
21. Hardouin V., Vandanjon L., Jaouen P., Robert J.M. *Procédée combinée extraction-membranes pour l'isolement et la purification de pigments naturels*. Paris: Actes Colloque Inter-filtra Intermembranes; 1994:175–181.
22. Francezon N., Herbaut M., Bardeau J.-F., Cougnon C., Bélanger W., Tremblay R., Jacquette B., Dittmer J., Pouvreau J.-B., Mouget J.-L., Pasetto P. Electrochromic properties and electrochemical behavior of marennine, a bioactive blue-green pigment produced by the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Mar. Drugs.* 2021;19(4):231.
23. Schubert H., Gérard G., Robert J.-M., Sagert S., Rincé Y. *In-vivo* fluorescence measurement of photosynthesis of *Haslea ostrearia* Simonsen in relation to marennine content. *Diatom Res.* 1995;10(2):341–349.
24. Polyakova S.L., Davidovich O.I., Podunay Y.A., Davidovich N.A. Modification of the ESAW culture medium used for cultivation of marine diatoms. *J. Mar. Biol.* 2018;3(2):73–80.
25. Gastineau R., Turcotte F., Pouvreau J.-B., et al. Marennine, promising blue pigments from a widespread *Haslea* diatom species complex. *Mar. Drugs.* 2014;12(6):3161–3189.
26. Reijenga J.C., Hoof A.J., Loon, A., Teunissen B. Development of methods for the determination of pK_a values. *Anal. Chem. Insights.* 2013;8(1):53–71.
27. Gastineau R., Hansen G., Davidovich N.A., Davidovich O.I., Bardeau J.-F., Kaczmarek I., Ehrman J.M., Leignel V., Hardivillier Y., Jacquette B., Poulin M., Morançais M., Fleurence J., Mouget J.-L. A new blue-pigmented hasleoid diatom, *Haslea provincialis*, from the Mediterranean Sea. *Eur. J. Phycol.* 2016;51(2):156–170.
28. Pouvreau J.-B., Morançais M., Massé G., Rosa P., Robert J.-M., Fleurence J., Pondaven P. Purification of the blue-green pigment ‘marennine’ from the marine tychope-lagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Environ. Boil. Fishes.* 2006;18(6):769–781.
29. Pouvreau J.-B., Morançais M., Fleurence J., Pondaven P. Method for the quantification of the blue-green pigment ‘marennine’ synthesized by the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC gel-filtration and photodiode-array detection. *J. Appl. Phycol.* 2007;19(3):263–270.
30. Prasetya F.S., Gastineau R., Poulin M., et al. *Haslea nusantara* (Bacillariophyceae), a new blue diatom from the Java Sea, Indonesia: morphology, biometry and molecular characterization. *Plant Ecol. Evol.* 2019;152(2):188–202.
31. Gastineau R., Hansen G., Poulin M., et al. *Haslea silbo*, a novel cosmopolitan species of blue diatoms biology. *Biology.* 2021;10(4):328.

Поступила в редакцию 22.04.2024

После доработки 28.10.2024

Принята в печать 13.12.2024

SHORT COMMUNICATIONS

Some physico-chemical characteristics of the marennine-like pigment synthesized by the marine diatom *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta)

N.A. Davidovich , E.S. Kirienko 

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

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

Marennine and marennine-like pigments produced by certain diatom species of the genus *Haslea* are unique water-soluble compounds with several valuable properties. The exact chemical structure of these pigments has not been fully elucidated, but data on the physical and chemical characteristics of marennines have been obtained primarily for *H. ostrearia*. Over the past fifteen years, four additional species producing marennine have been identified, which opens up the opportunity to explore the diversity within the genus *Haslea* and, consequently, the diversity of marennines. Diatom representatives of the genus *Haslea*, that produce marennine, accumulate pigment at the apices of their cells and release it into the external environment, giving the surrounding water a greenish-blue color. Although the exact role of marennine in diatom cellular function is unknown, it is believed to act as a photoprotectant, absorbing light in the ultraviolet (UV), violet, and red wavelengths, as it does not participate in photosynthesis. The chemical composition and spectral properties of marennines produced by different *Haslea* species vary slightly, although the physical and chemical characteristics of marennine from *H. ostrearia* have been extensively studied. While the physicochemical properties of marennine in some species, particularly *H. ostrearia*, have been described in detail, the pigment in *H. karadagensis*, an endemic species of the Black Sea region, remains largely unexplored. The study presents a comparison of the spectrophotometric and physicochemical characteristics of marennine from *H. karadagensis* and *H. ostrearia* under given conditions. The apparent dissociation constants and isobestic points of marennine from both diatom species were determined.

Keywords: *diatoms, Haslea karadagensis, marennine, pigment, spectrophotometry, isobestic points, apparent dissociation constants*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 24-24-00054. The materials of the Scientific and Educational Center for Collective Use of FRC IBSS “Collection of diatoms of the World Ocean” were used in this work. No laboratory animals or human subjects were involved in the research. The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Сведения об авторах

Давидович Николай Александрович – докт. биол. наук, зав. лабораторией водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: nickolaid@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3510-0453>

Кириенко Екатерина Сергеевна – инженер лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел.: 8-365-622-62-12; e-mail: esk-00@bk.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-4110-8424>



Антиоксиданты: полезные, вредные или нейтральные в плане влияния на старение и продолжительность жизни? Все зависит от обстоятельств*

А.Н. Хохлов 

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

Обсуждается проблема эффективности антиоксидантов в плане их влияния на «нормальное» старение и возрастные болезни. Подчеркивается, что в течение многих лет антиоксиданты считались самыми перспективными геропротекторами, способными замедлять старение, лечить возрастные болезни и увеличивать как среднюю, так и максимальную продолжительность жизни животных и человека. Однако, как отмечается, в последние годы ситуация начала кардинально меняться. Рассматриваются методологические аспекты этой проблемы — в частности, подчеркивается сложность корректного подбора эффективных концентраций таких препаратов в экспериментально-геронтологических исследованиях как на многоклеточных организмах, так и на клеточных культурах. Анализируются данные литературы, свидетельствующие о том, что во многих случаях антиоксиданты, к сожалению, могут быть даже вредны для организма, вызывая «парадоксальный» окислительный стресс и подавляя некоторые важные физиологические функции.

Ключевые слова: старение, продолжительность жизни, свободные радикалы, питание, экспериментальная геронтология, синтетические и природные антиоксиданты, возрастные болезни, геропротекторы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-4

Идея о том, что антиоксиданты могут быть эффективными геропротекторами (т.е. соединениями, замедляющими старение и увеличивающими продолжительность жизни), получила широкое распространение во второй половине XX века. Она основывалась на концепции о ведущей роли свободных радикалов — главным образом, активных форм кислорода — в процессе старения и возникновении возрастных болезней. Концепция изначально была сформулирована Д. Харманом [1] и Н.М. Эмануэлем [2], а затем подвергалась многочисленным модификациям при участии большого количества ученых-геронтологов. В частности, большую роль в этом процессе сыграл В.П. Скулачев [3], долгие годы занимавшийся изучением возможности использования в качестве геропротекторов митохондриально-ориентированных антиоксидантных соединений. В результате появилось огромное количество экс-

периментальных работ, обосновывающих точку зрения, согласно которой введение в организм препаратов, перехватывающих свободные радикалы, приводит к замедлению процесса старения и увеличению как средней, так и максимальной продолжительности жизни. Фактически на протяжении многих лет геронтологи использовали термины «геропротекторы» или «антивозрастные препараты» (geroprotectors / anti-aging drugs) как раз для обозначения самых разных антиоксидантов. Необходимо подчеркнуть, что в этих случаях речь шла о синтетических антиоксидантах (в противовес природным), концентрации которых, как тогда казалось, можно достаточно легко контролировать (см. ниже).

Надо отметить, что термин «геропротекторы» был введен в обращение учеными из Института химической физики АН СССР в последней четверти прошлого столетия специально для

* Статья основана на лекции, прочитанной автором в рамках симпозиума «Генетика и системная биология старения» на 14-й Международной Мультиконференции «Биоинформатика регуляции и структуры геномов / системная биология» (Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, BGRS/SB-2024), Новосибирск, Россия, 5-10 августа 2024 г.

синтетических антиоксидантов, разработанных в этой организации [4]. Мы довольно подробно исследовали один из них, эпигид (гидрохлорид 2-этил-6-метил-3-оксипиридина), в плане его возможного влияния на «стационарное старение» [5] культивируемых клеток разной природы [6, 7]. Оказалось, что эпигид по-разному действует на разные клетки. В частности, нам удалось замедлить «стационарное старение» нормальных эмбриональных диплоидных фибробластов только на поздних пассажах, что выразилось в увеличении высоты «плато» (насыщающей плотности, являющейся показателем биологического возраста клеток) на кривой их роста. Кроме того, мы не смогли с помощью эпигида достоверно изменить высоту «плато» на кривой роста трансформированных клеток китайского хомячка, обладающих неограниченным пролиферативным потенциалом и требующих, по-видимому, очень мощных геропротекторов для «омоложения» [8]. В результате мы уже тогда заключили, что, вероятно, невозможно с помощью антиоксидантов помочь «молодым» клеткам с высокими показателями жизнеспособности и пролиферативной активности стареть медленнее. Если, конечно, мы не вызываем у них специально окислительный стресс тем или иным способом (например, с помощью повышения содержания кислорода в воздушной смеси над культуральной средой), что довольно часто используется в современных экспериментально-геронтологических работах [9, 10]. В последующем мы провели много других экспериментов по исследованию потенциальных геропротекторо-антиоксидантов на клеточных культурах. Это были тот же эпигид, а также дибунол, митохондриально-направленный антиоксидант SkQ и др. К сожалению, ни в одном эксперименте нам не удалось получить данные, представляющие интерес в геронтологическом плане. Однако у коллег, работавших на «нестандартных» культурах, как уже отмечалось [9, 10], часто получались вполне обнадеживающие результаты. И конечно, многое зависело от той модели клеточного старения, которую исследователи использовали в своих экспериментах. А надо сказать, что эти модели принципиально различаются по концептуальным принципам и подходам [5, 11]. Нам, в частности, не очень нравятся модели, в которых авторы специально ухудшают клетки с помощью тех или иных факторов (окислительный стресс, H_2O_2 , митомицин C, этанол, ионизирующая радиация, доксорубин и др.), вызывающих повреждения ДНК. Мы предпочитаем, чтобы такие повреждения возникали **вследствие** клеточного старения, а не являлись его **причиной** [12]. И если мы работаем на нормальных фибробластах человека, то очень желательно, чтобы они были получены от практически здоровых доноров, иначе артефакты неминуемы [13].

Многочисленные исследования геропротекторных свойств антиоксидантов в экспериментах на лабораторных животных, на первый взгляд, продемонстрировали их значительную эффективность в плане замедления старения и увеличения продолжительности жизни — как средней, так и максимальной. Однако, **во-первых**, оставалось неясным, насколько возможно использовать полученные результаты для людей — включая их применение для подавления развития возрастных болезней типа спорадической болезни Альцгеймера [14]. Казалось бы, признание многими исследователями ведущей роли свободных радикалов в этиологии и патогенезе этого заболевания должно было автоматически означать, что бороться с ним нужно с помощью антиоксидантов. И таких попыток было предпринято огромное количество. С одним «но». На сайте организации Alzheimer's Society в разделе «Антиоксиданты и деменция» написано, что хотя лабораторные испытания на животных перспективных в этом плане препаратов давали обнадеживающие результаты, на сегодняшний день, к сожалению, не существует надежных данных о возможности использования антиоксидантов для предотвращения или лечения болезни Альцгеймера у людей.

И во-вторых, очень много вопросов возникало по поводу корректного выбора контрольных объектов и формирования когорт в таких экспериментах [15]. Как правило, это были животные либо с определенными генетическими аномалиями, либо помещенные в явно неблагоприятные условия обитания [16]. В обоих случаях у них развивался значительный окислительный стресс. Очевидно, что положительное влияние антиоксидантов на их жизнеспособность было вполне ожидаемым. Во всех упомянутых лабораторных экспериментах по изучению болезни Альцгеймера ученые использовали животных с так называемой «модельной» болезнью, симптомы которой в первом приближении соответствовали симптомам «настоящего» заболевания. Действительно, в таких работах были получены очень интересные данные о роли окислительного стресса в развитии патологических процессов в головном мозге, но, на наш взгляд, они не никак не продвинули человечество в понимании того, как возникает болезнь Альцгеймера и каким образом ее можно было бы лечить. Видимо, этот вывод касается большей части работ, посвященных попыткам повлиять на это заболевание [14].

Кроме того, интерпретация полученных в упомянутых геронтологических исследованиях результатов во многом определялась также существующими значительными различиями в представлениях о том, что же это все-таки такое — старение [17]. Очень часто классическое определение старения как совокупности возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятно-

сти смерти в отсутствие очевидной патологии, просто игнорировалось.

Мы не должны забывать о том, что свободные радикалы в организме часто совершенно необходимы для его нормального функционирования, так что нельзя сказать, что их устранение всегда обязательно полезно [18, 19]. И об этом свидетельствует очень большое количество соответствующих публикаций. В частности, целый специальный выпуск журнала «Oxidative Medicine and Cellular Longevity», озаглавленный «Harmful and Beneficial Role of ROS 2020» («Вредная и полезная роль активных форм кислорода 2020»), был посвящен этому вопросу [20].

Необходимо также подчеркнуть следующее обстоятельство: если передозировка природных антиоксидантов, попадающих в наш организм с пищей, практически невозможна, то в случае синтетических антиоксидантов [21] она становится реальной и происходит в очень многих случаях, так как очень непросто определить концентрацию этих препаратов в органах и тканях при поступлении их с питьем и пищей. Как ни парадоксально, на протяжении многих лет исследователи как раз утверждали, что действующие концентрации синтетических антиоксидантов очень легко контролировать. Однако фармакодинамику и фармакокинетику никто не отменял. Да и в клеточных культурах введенные препараты непрерывно взаимодействуют как с самими клетками, так и с компонентами культуральной среды, что приводит к постоянному изменению их реальной концентрации. Передозировка антиоксидантов, с одной стороны, может парадоксально вызывать окислительный стресс (так называемый «антиоксидантный парадокс» [22]), а с другой — подавлять соответствующие функции, для которых свободные радикалы необходимы [19]. В частности, было показано, что увеличенная продукция активных форм кислорода играет очень важную роль в остром β -адренергически-индуцированном инотропном ответе кардиомиоцитов. Этот стимуляторный эффект опосредован сАМР–РКА-зависимым и Ca^{2+} -независимым сигналингом [23]. Кроме того, известно, что свободные радикалы (как активные формы кислорода, так и реакционноспособные производные азота) необходимы для нормальной работы иммунной системы, обеспечивающей защиту организма от различных инфекций, а также для процессов созревания клеточных структур и для поддержания функционирования систем клеточного сигналинга [24]. В частности, известно, что фагоциты (нейтрофилы, макрофаги, моноциты) высвобождают свободные радикалы для уничтожения проникающих в организм патогенных микробов, что является важной составляющей наших систем защиты от заболеваний [25].

Необходимо упомянуть также весьма парадоксальную, на первый взгляд, точку зрения, согласно которой прооксиданты в некоторых случаях могут быть даже полезнее для организма, чем антиоксиданты [26].

Таким образом, складывается впечатление, что популярная идея, согласно которой антиоксиданты являются панацеей против «нормального» старения, на сегодняшний день не может считаться доказанной на 100%. Очевидно, что с помощью таких препаратов мы можем довольно эффективно бороться с окислительным стрессом, возникающим при многих патологических процессах, и таким образом увеличивать среднюю продолжительность жизни (а иногда, возможно, даже максимальную). Можно полагать, что в некоторых случаях это происходит из-за подавления «окислительно-стрессовых» проявлений возрастных болезней, что, в принципе, тоже неплохо, но, к сожалению, никак не приближает нас к пониманию механизмов функционирования «фонтана вечной молодости».

Собственно, обсуждаемая ситуация напоминает мне таковую с «плохим» и «хорошим» холестерином [27]. В течение многих лет считалось, что поступление в организм избыточного холестерина, а также повышенное его содержание в плазме крови вредны в 100% случаев. Однако оказалось, что все не так просто и зависит от метаболического статуса конкретного человека, так что во многих случаях ни первое, ни второе не оказывает никакого вредоносного действия на организм, а чрезвычайно распространенные во всем мире «антихолестериновые» препараты статины часто могут способствовать развитию проблем с сердечно-сосудистой системой, особенно у лиц пожилого возраста.

По всей видимости, если у кого-то нет особых проблем со здоровьем и ему дают антиоксиданты, они могут ему только навредить. Поэтому мне кажется нецелесообразной ставшая чрезвычайно распространенной постоянная реклама антиоксидантных добавок в пищу, косметике, напитках и т.п. Игнорирование весьма возможных побочных эффектов может, к сожалению, привести к достаточно неприятным последствиям.

Краткое заключение: Возможно, нам все-таки нужно взять на вооружение — по крайней мере, в некоторых случаях — слоган «Свободу радикалам!».

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology*. 2009;10(6):773–781. doi 10.1007/s10522-009-9234-2
2. Emanuel N.M. Free radicals and the action of inhibitors of radical processes under pathological states and ageing in living organisms and in man. *Quart. Rev. Biophys.* 1976;9(2):283–308. doi 10.1017/S0033583500002420
3. Skulachev V.P. What is “phenoptosis” and how to fight it? *Biochemistry (Moscow)*. 2012;77(7):689–706. doi 10.1134/S0006297912070012
4. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Should we consider water and antibiotics to be geroprotectors? *Adv. Gerontol.* 2023;13(4):202–205. doi 10.1134/S2079057024600460
5. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors. *Curr. Aging Sci.* 2013;6(1):14–20. doi 10.2174/18746098112059990009
6. Хохлов А.Н., Ушаков В.Л., Капитанов А.Б., Наджарян Т.Л. Влияние геропротектора хлоргидрата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на пролиферацию клеток *Acholeplasma laidlawii*. *Докл. АН СССР*. 1984;274(4):930–933.
7. Хохлов А.Н., Головина М.Э., Чиркова Е.Ю., Наджарян Т.Л. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. III. Влияние плотности посева, геропротектора-антиоксиданта, стационарного старения. *Цитология*. 1987;29(3):353–357.
8. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение. *Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Сер. Общие пробл. физ.-хим биологии, Т. 9*. ВИНТИ: Москва, 1988. 176 с.
9. von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* 1995;220(1):186–193. doi 10.1006/excr.1995.1305
10. Saretzki G., Feng J., von Zglinicki T., Villeponteau B. Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1998;53(6):B438–B442. doi 10.1093/gerona/53A.6.B438
11. 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. doi 10.3103/S0096392522030087
12. Khokhlov A.N. Evolution of the term cellular senescence and its impact on the current cytogerontological research. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013;68(4):158–161. doi 10.3103/S0096392513040123
13. Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998;95(18):10614–10619. doi 10.1073/pnas.95.18.10614
14. Khokhlov A.N. Why freshwater hydra does not get Alzheimer’s disease. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(3):198–204. doi 10.3103/S0096392523700104
15. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(2):59–62. doi 10.3103/S0096392518020049
16. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S. et al. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents. *Aging (Albany N.Y.)*. 2011;3(11):1110–1119. doi 10.18632/aging.100404
17. Khokhlov A.N. Gerontology in the 21st century: From failures to advances. Hopefully. *Adv. Gerontol.* 2023;13(1):1–3. doi 10.1134/S2079057024600289
18. McCann S. Antioxidants: good, bad or indifferent. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(1):1–2. doi 10.1038/s41409-018-0397-9
19. Di Meo S., Venditti P. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020;2020:9829176. doi 10.1155/2020/9829176
20. Di Meo S., Venditti P., Victor V.M., Napolitano G. Harmful and beneficial role of ROS 2020. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022;2022:9873652. doi 10.1155/2022/9873652
21. Stokes P., Belay R.E., Ko E.Y. Synthetic antioxidants. In: *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART and Antioxidants*. Springer, 2020. pp. 543–551. doi 10.1007/978-3-030-32300-4_44
22. Henkel R., Agarwal A. Harmful effects of antioxidant therapy. In: *Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART and Antioxidants*. Springer, 2020. pp. 845–854. doi 10.1007/978-3-030-32300-4_68
23. Andersson D.C., Fauconnier J., Yamada T., Lacampagne A., Zhang S.J., Katz A., Westerblad H. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.* 2011;589(7):1791–1801. doi: 10.1113/jphysiol.2010.202838
24. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 2008;4(2):89–96.
25. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002;82(1):47–95. doi 10.1152/physrev.00018.2001
26. Carrocho M., Ferreira I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 2013;51:15–25. doi 10.1016/j.fct.2012.09.021
27. Khokhlov A.N. On the cholesterol theory of aging-2022. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(4):292–296. doi 10.3103/S0096392522040034

Поступила в редакцию 15.10.2024

После доработки 23.12.2024

Принята в печать 11.01.2025

OPINION ARTICLE

Antioxidants: good, bad, or ineffective in terms of aging and lifespan? It depends

A.N. Khokhlov 

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

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

The problem of antioxidant efficiency in terms of their impact on “normal” aging and age-related diseases is discussed. It is emphasized that for many years antioxidants were considered the most promising geroprotectors (anti-aging drugs) capable of slowing down aging, treating age-related diseases and increasing both the average and maximum lifespan of animals and humans. However, as noted, in recent years the situation has begun to change dramatically. The methodological aspects of this problem are considered – in particular, the complexity of the correct selection of effective concentrations of such drugs in experimental gerontological studies on both multicellular organisms and cell cultures is emphasized. The literature data is analyzed, indicating that, in many cases, antioxidants, unfortunately, can even be harmful to the body, causing “paradoxical” oxidative stress and suppressing some important physiological functions.

Keywords: *aging, lifespan, free radicals, nutrition, experimental gerontology, synthetic and natural antioxidants, age-related diseases, geroprotectors*

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторе

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

**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ» в 2024 году**

№ Стр.

От редакции

- Кирпичников М.П., Ильина Н.А., Ахаев Д.Н., Белякова Г.А., Осмоловский А.А.*
Концепция развития биологического образования в Российской Федерации **4** 253

Обзоры

- Малахов В.В., Ежова О.В., Екимова И.А., Ганцевич М.М.* Общие закономерности онтогенеза *Ambulacraria*..... **4** 259
- Миронова Т.В., Таганович А.Д., Кадушкин А.Г., Макаревич В.В., Шиловский И.П., Хаитов М.Р.* Роль компонентов иммунного ответа первого и семнадцатого типов в развитии аллергических заболеваний дыхательной системы..... **4** 280
- Фетисова Е.К., Воробьева Н.В., Мунтян М.С.* Рассеянный склероз. Некоторые особенности патологии и возможные пути терапии. Часть 1 **2** 87
- Фетисова Е.К., Воробьева Н.В., Мунтян М.С.* Рассеянный склероз. Некоторые особенности патологии и возможные пути терапии. Часть 2 **4** 269
- Фрайкин Г.Я.* Фотосенсибилизированные реакции окислительного повреждения биомолекул: роль в генотоксических и цитотоксических процессах **3** 167

Оригинальные исследования

- Адамова В.В., Украинский П.А.* Моделирование пространственного распространения европейского наземного моллюска *Cochlodina laminata* (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) в восточной части ареала..... **1** 57
- Александров О.С., Романов Д.В.* Изучение структурных особенностей нетранскрибируемых спейсеров 5S-рДНК *Citrus sinensis* и *C. reticulata* **4** 298
- Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В.* Влияние метилирования промоторов генов регуляции апоптоза на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов у облученных людей..... **4** 346
- Булавин И.В., Корзина Н.В., Мирошниченко Н.Н., Саплев Н.М., Солдатов Д.К., Шевчук О.М.* Клональное микроразмножение розы эфиромасличной сорта «Фестивальная»: морфология, структура и плоидность микропобегов **3** 235

<i>Варыбок С.Д., Онинченко В.Г., Гулов Д.М., Елумеева Т.Г.</i> Функциональные признаки растений и разнообразие субальпийских пестрокостровых лугов Северо-Западного Кавказа	4	330
<i>Воробьева Н.В., Мунтян М.С.</i> Особенности образования нейтрофильных внеклеточных ловушек у кроликов породы шиншилла	1	66
<i>Гордеев И.И., Токарев Ю.С., Давыдов Е.А., Екимов И.А., Дроздов К.А., Яценко И.О., Яценко О.В., Кочунова Н.А., Бухарова Н.В., Кондратьев М.С., Миролюбов А.А., Рожкова-Тимина И.О., Макеев С.С., Гришина Д.Ю., Плксин А.Д., Семенов А.А.</i> Комплексная научно-исследовательская экспедиция «Крильон 2023»: первые находки и предварительные результаты	1	28
<i>Граф А.В., Маклакова А.С., Маслова М.В., Крушинская Я.В., Гусева А.А., Соколова Н.А.</i> Влияние пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крысят первого месяца жизни	2	151
<i>Гудкова В.Р., Гвоздев Д.А., Цораев Г.В., Мойсенович А.М., Максимов Е.Г.</i> Осветительная установка для определения эффективности действия фотосенсибилизаторов в отношении клеточных культур на основе светодиодов высокой мощности	4	306
<i>Иванова Д.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Радченко И.Г.</i> Сезонная динамика фитопланктона озера Кисло-Сладкое, частично изолированного от Белого моря, в период двухлетней меромиксии	2	129
<i>Ильина Т.Н., Баишникова И.В., Якимова А.Е., Зайцева И.А.</i> Содержание витаминов А и Е в тканях рыжей полевки (<i>Myodes (Clethrionomys) glareolus</i>) и обыкновенной бурозубки (<i>Sorex araneus</i>), обитающих в Карелии	1	72
<i>Колесников И.А., Бисерова Н.М.</i> Структурные механизмы защиты паразитических личинок от иммунных факторов хозяина в системе <i>Triaenophorus nodulosus</i> (Cestoda)—окунь	2	112
<i>Корневский А.В., Милютин Ю.П., Бочковский С.К., Соколов Д.И., Сельков С.А., Беспалова О.Н.</i> Влияние фракций клеточного лизата естественных киллеров на пролиферацию клеток трофобласта в системе <i>in vitro</i>	3	202
<i>Кривина Е.С., Синетова М.А., Редькина В.В., Соромотин А.В., Жеребятнева Н.В., Темралева А.Д.</i> Новые штаммы рода <i>Vischeria</i> (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): состав жирных кислот и их возможное использование в качестве биодобавок для животных и человека	3	193
<i>Куприянова Е.В., Манахова К.А., Ежова Т.А.</i> Взаимодействующие гены <i>PARG1</i> и <i>EXA1</i> являются важными регуляторами аутоиммунитета у растений	4	287
<i>Лобанова А.А., Коровина А.Н., Кошкина Д.О., Черникова П.А., Феофанов А.В., Студитский В.М., Нилов Д.К., Малюченко Н.В.</i> Гель-электрофорез как метод классификации ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз 1 и 2	4	322
<i>Лукашев Е.П., Нокс П.П., Страховская М.Г., Пащенко В.З.</i> Краситель 10-N-нонилакридиновый оранжевый как флуоресцентный индикатор действия антисептика октенидина на мембраны хроматофоров <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1	12

<i>Мирненко Э.И.</i> Содержание, состав и динамика фотосинтетических пигментов в водохранилищах р. Кальмиус Донецкой Народной Республики.....	4	353
<i>Моцарь Е.В., Шевелева А.А., Шарко Ф.С., Митрофанова И.В., Чирков С.Н.</i> Секвенирование и анализ полного генома российского изолята вируса А черешни (cherry virus A)	3	221
<i>Павлюченкова А.Н., Воробьева Н.В., Дашкевич А.А., Зиновкина Л.А., Иванеев А.И., Ермолин М.С., Федотов П.С., Зиновкин Р.А., Челомбитько М.А., Черняк Б.В.</i> Наночастицы городской пыли вызывают провоспалительную активацию нейтрофилов и макрофагов	3	211
<i>Печкова М.Г., Кирюхина О.О., Тарасова О.С.</i> Исследование роли паннексина 1 в регуляции сократительной активности продольного гладкомышечного слоя портальной вены мыши	2	102
<i>Полошеев Т.В., Онопченко В.Г., Сандалова Е.В., Джатдоева Т.М., Елумеева Т.Г.</i> Функциональные признаки листьев и стратегии растений субальпийских ветвистых лугов северо-западного Кавказа	1	21
<i>Пьянкова Е.В., Максимова Ю.Г.</i> Влияние производных графена на биопленкообразование <i>Candida maltose</i>	3	227
<i>Репкова М.Н., Зарытова В.Ф., Мазурков О.Ю., Мазуркова Н.А., Макаревич Е.В., Филиппова Е.И., Некрасов М.Д., Курдюшкин М.С., Левина А.С.</i> Эффективное ингибирование репликации вируса простого герпеса 1-го типа <i>in vitro</i> с помощью олигонуклеотид-содержащих нанокompозитов	4	000
<i>Соколова И.Б., Шуваева В.Н.</i> Динамика развития системной воспалительной реакции и нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации церебральных артерий.....	4	315
<i>Сурков М.М., Мамчур А.А., Станишинева-Коновалова Т.Б., Рубин А.Б., Ярошевич И.А.</i> Теоретическое описание паккерных состояний циклических групп каротиноидов	1	50
<i>Хоцинская К.И., Сергеева О.В., Кирдянов А.В., Николаев А.Н., Акулинина К.В., Кошурникова Н.Н., Колмогоров А.И., Арсак А.</i> Климатический отклик радиального прироста <i>Larix cajanderi</i> в Северной и Центральной Якутии.....	2	137
<i>Чжан С., Николаев А.Н., Колмогоров А.И., Васильев М.С., Пестрякова Л.А.</i> Влияние гидротермических условий увлажнения на радиальный прирост лиственницы в Центральной Якутии.....	2	144
<i>Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э.</i> Морфологические особенности иннервации органов средостения крысы в разные сроки постнатального онтогенеза.....	3	184
<i>Широких И.Г., Мокрушина С.Э.</i> Стрептомицеты из ризосферы трех лекарственных растений в качестве стимуляторов роста растений и агентов биоконтроля.....	2	121
<i>Шуваева В.Н., Горшкова О.П.</i> Роль каналов ВКСа в дилатации пилальных артерий у крыс разного возраста	1	3

Краткие сообщения

- Давидович Н.А., Кириенко Е.С. Некоторые физико-химические характеристики
мареннин-подобного пигмента, синтезируемого морской диатомовой водорослью
Haslea karadagensis (Bacillariophyta)4 360

Мнения

- Хохлов А.Н. Антиоксиданты: полезные, вредные или нейтральные в плане влияния
на старение и продолжительность жизни? Все зависит от обстоятельств.....4 367

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 2023 г. составляет 0,892, показатель CiteScore 2023 (Scopus) англоязычной версии — 1,0.

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

Общая информация

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

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полуторный, отступ — 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается шаблон статьи). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объемы, значительно 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](#)