

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 80 • № 2 • 2025 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Абрамочкин Д.В., Джуманиязова И.Х., Пустовит О.Б., Филатова Т.С.
Адаптивные изменения электрической активности сердца эктотермных
позвоночных при смене времен года. 53
- Силина М.В., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. Роль гипоксии
и транскрипционных факторов HIF в развитии язвенного колита
и ассоциированного с ним колоректального рака 65

Оригинальные исследования

- Антонова Е.П., Илюха В.А., Якимова А.Е., Баишникова И.В.,
Ильина Т.Н. Возрастные изменения тканевой антиоксидантной защиты
у лесной мышовки (*Sicista betulina*, Rodentia) на северной периферии ареала
обитания 80
- Горшкова О.П., Шуваева В.Н. Изменения регуляции церебральных
вазоактивных реакций при старении: вклад H_2S в cGMP-индуцированную
дилатацию 89
- Васюченко Е.П., Холина Е.Г., Федоров В.А., Страховская М.Г.,
Коваленко И.Б., Рубин А.Б. Молекулярное моделирование
взаимодействия метиленового синего с виropином коронавируса
SARS-CoV-2 96
- Малыгин М.В., Васенькова Л.А., Показаньева М.П., Киселева И.С.
Участие активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов
в формировании аэренхимы корня ячменя в условиях гипоксии 105
- Черткова Н.Г., Костылев П.И., Усатов А.В., Калинина Н.В.
Идентификация генов энергии прорастания *AG* у дигампоидных андрогенных
растений риса 112
- Силкин Ю.А., Силкин М.Ю., Силкина Е.Н., Омельченко С.О.
Экто-АТФазы, морфометрия и теплопродукционная активность эритроцитов
хрящевых и костистых черноморских рыб 119

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 80 • No. 2 • 2025 • APRIL — JUNE

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Reviews

- Abramochkin D.V., Dzhumaniiazova I., Pustovit O.B., Filatova T.S.
Adaptive seasonal changes in cardiac electrical activity of ectothermic vertebrates. 53
- Silina M.V., Dzhililova D.Sh., Makarova O.V. The role of hypoxia
and HIF transcription factors in the development of ulcerative colitis
and associated colorectal cancer 65

Research articles

- Antonova E.P., Ilyukha V.A., Yakimova A.E., Baishnikova I.V., Ilyina T.N.
Age-related changes in the tissue antioxidant system of the northern birch mouse
(*Sicista betulina*, Rodentia) at the northern periphery of its habitat area 80
- Gorshkova O.P., Shuvaeva V.N. Changes in the regulation of cerebral vasoactive
reactions and aging: the contribution of H₂S to cGMP-induced dilation. 89
- Vasyuchenko E.P., Kholina E.G., Fedorov V.A., Strakhovskaya M.G.,
Kovalenko I.B., Rubin A.B. Molecular modeling of the methylene blue
interaction with the SARS-CoV-2 coronavirus viroporin 96
- Malygin M.V., Vasenkova L.A., Pokazanieva M.P., Kiseleva I.S.
Reactive oxygen species and antioxidant enzymes participate in the formation
of aerenchyma in barley root under hypoxia 105
- Chertkova N.G., Kostylev P.I., Usatov A.V., Kalinina N.V.
Identification of *AG* germination energy genes in dihaploid androgenic rice plants 112
- Silkin Yu.A., Silkin M.Yu., Silkina E.N., Omelchenko S.O.
Ecto-ATPases, morphometry and heat production activity of erythrocytes
of cartilaginous and teleost fishes of the Black Sea 119

© Moscow University Press,
“Lomonosov Biology Journal,” 2025

ОБЗОР

УДК 574.24



Адаптивные изменения электрической активности сердца эктотермных позвоночных при смене времен года

Д.В. Абрамочкин^{*} , И.Х. Джуманиязова , О.Б. Пустовит , Т.С. Филатова

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

^{*}e-mail: abram340@mail.ru

Одна из проблем, с которой сталкиваются эктотермные животные при снижении температуры окружающей среды, заключается в негативных изменениях параметров электрической активности кардиомиоцитов, что приводит к снижению производительности сердца (минутного объема сердечного выброса). Это особенно важно для эктотермных животных, сохраняющих высокую активность в холодное время года. В обзоре рассматриваются известные на данный момент физиологические механизмы, позволяющие эктотермным позвоночным – в первую очередь различным видам рыб – частично нивелировать вызванные холодом изменения электрической активности сердца, а также поддерживать его работоспособность на достаточном для активной жизнедеятельности уровне при наступлении зимы. Эти механизмы включают увеличение плотности ионных токов кардиомиоцитов, а в некоторых случаях – изменения параметров стационарной активации и инактивации. Также в обзоре обсуждаются изменения ионных токов и электрической активности, вызванные изменениями температуры в остром эксперименте – в частности, рассматривается воздействие температуры на возбудимость кардиомиоцитов. Рассматриваемые в обзоре данные получены главным образом в экспериментах на костистых рыбах, поскольку среди всех эктотермных позвоночных именно они относительно неплохо исследованы с точки зрения электрофизиологии сердца.

Ключевые слова: кардиомиоциты, потенциал действия, ионные токи, эктотермные животные, температура, ионные каналы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-1

Введение

Сердце позвоночных животных начинает сокращаться еще на ранней стадии эмбрионального развития. На протяжении всей жизни оно обеспечивает стабильное функционирование организма в меняющихся условиях среды. Для обеспечения адекватной работы сердца существует множество механизмов нервной и гуморальной регуляции. Посредством такой регуляции в первую очередь происходит изменение минутного объема сердечного выброса и связанной с ним скорости кровотока в соответствии с метаболическими потребностями тканей. У эктотермных животных скорость метаболизма прямо зависит от температуры окружающей среды. Следовательно, и сердечная деятельность эктотермных организмов вынужденно изменяется в зависимости от температурных условий, что наиболее актуально для обитателей умеренных и северных широт, сталкивающихся в течение года с необходимостью выживать при околонулевых и даже отрицательных температурах окружающей среды. Характерно, что многие виды

рыб способны оставаться активными и даже нереститься при температурах около или ниже 0°C, в то время как сердце негиберирующих эндотермных животных останавливается даже уже при существенно более высокой температуре [1].

Такие возможности сердца эктотермных позвоночных обеспечиваются рядом морфофизиологических особенностей их кардиомиоцитов. Одной из наиболее ярких особенностей сердца эктотермных позвоночных является регулирование объема сердечного выброса преимущественно за счет изменения силы сокращения сердечной мышцы и, как следствие, ударного объема, в отличие от сердец млекопитающих и птиц, где регуляция минутного объема сердечного выброса реализуется в большей степени за счет изменений частоты сердечных сокращений (ЧСС). Возможность в широких пределах изменять силу сокращения миокарда обеспечивается несколькими факторами: кардиомиоциты эктотермных позвоночных значительно более длинные, узкие и растяжимые по сравнению с такими клетками у млекопитающих; их саркоме-

ры имеют повышенную чувствительность к кальцию [2, 3]. В итоге многократное снижение ЧСС, обусловленное понижением температуры, не приводит к столь драматичному уменьшению минутного объема сердечного выброса, как в сердцах со слабой регуляцией ударного объема [4]. Другой важнейшей особенностью миокарда эктотермных позвоночных, позволяющей поддерживать адекватные параметры сердечной деятельности в условиях низких температур, являются долгосрочные изменения паттерна электрической активности, которые развиваются постепенно при смене времен года и позволяют частично компенсировать прямые эффекты понижения температуры в отношении электрической, а, следовательно, и сократительной активности сердца. Механизмы такой адаптации к смене времен года включают изменения характеристик почти всех изученных в этом отношении ионных токов кардиомиоцитов. Именно этим механизмам посвящен настоящий обзор. Наибольшее количество исследований сезонных адаптаций электрической активности миокарда было проведено в последние 25 лет на сердцах различных видов костистых рыб – в том числе, авторами настоящего обзора. Таким образом, общие принципы острых и долговременных изменений электрической активности миокарда под действием низких температур будут рассмотрены на примере рыб умеренных и северных широт, а затем будут приведены немногочисленные имеющиеся данные о сезонных изменениях электрической активности сердца у других групп эктотермных позвоночных.

В ряде обсуждаемых ниже работ авторы сравнивали кардиомиоциты животных, отловленных в дикой природе в разное время года, в таком случае речь идет об эффектах сезонной *акклиматизации* (acclimatization) животных. Другой термин будет использован вслед за авторами экспериментальных работ, в которых различные группы животных выдерживали в лабораторных условиях в течение определенного времени при различной температуре [5, 6]. В этом случае рассматриваются эффекты температурной *акклимации* (acclimation). Ясно, что в первом случае животные подвергаются воздействию целого комплекса изменившихся при смене сезонов факторов, среди которых есть и температура, а во втором – изменяется только температура, причем в искусственных условиях.

Ионные механизмы электрической активности миокарда эктотермных животных

Полноценные исследования ионных токов, формирующих электрическую активность в кардиомиоцитах позвоночных, стали возможными с середины 1980-х гг., после создания метода whole-cell пэтч-кламп и появления соответствующей необходимой для него аппаратуры, а также

после изобретения способов получения изолированных кардиомиоцитов с помощью обработки сердца протеолитическими ферментами. К этому времени лабораторные млекопитающие стали широко доступны для физиологических исследований, а эктотермные модельные животные, в первую очередь амфибии, стали терять популярность в качестве лабораторных животных. В связи с этим представления о ионных механизмах электрической активности миокарда сформировались в основном с опорой на данные, полученные на кардиомиоцитах различных видов млекопитающих, и лишь на рубеже столетий начались целенаправленные исследования ионных токов в кардиомиоцитах эктотермных животных. В последние годы актуальность таких исследований подтверждается возвращением целого ряда видов эктотермных позвоночных, прежде всего рыбок данио-реριο (*Danio rerio*), в число модельных объектов.

На рис. 1А представлена классическая схема, показывающая соотношение между пятью фазами потенциала действия (ПД) и основными ионными токами в желудочковом миоците человека. Фаза 0 (фаза деполяризации) формируется в рабочих кардиомиоцитах благодаря быстрому натриевому току I_{Na} . Затем следует фаза 1 (фаза первичной реполяризации), обусловленная инактивацией I_{Na} вкупе с активацией реполяризующего транзитного калиевого тока I_{to} , для которого характерна быстрая кинетика активации. В предсердных миоцитах человека к I_{to} добавляется другой быстро активирующийся реполяризующий ток I_{Kur} (калиевый ультрабыстрый ток задержанного выпрямления). У ряда грызунов (семейства мышьиные и беличьи) I_{to} и I_{Kur} выражены как в предсердных, так и в желудочковых миоцитах и имеют столь большую амплитуду, что в течение нескольких десятков миллисекунд доводят реполяризацию до конца [7–9], поэтому фазы 1, 2 и 3 ПД кардиомиоцитов этих животных слиты в единую фазу реполяризации. Фаза 2 (фаза плато), характеризующаяся медленной скоростью реполяризации, формируется за счет сбалансированности реполяризующих токов, а именно инактивирующегося I_{to} , и лишь частично активированных быстрого и медленного токов задержанного выпрямления (I_{Kr} и I_{Ks} соответственно), и деполяризующего кальциевого тока L-типа I_{CaL} , активация которого отстает по времени от I_{Na} и приходится на середину фазы 1. По мере усиления I_{Kr} и I_{Ks} фаза 2 переходит в фазу 3 (фазу окончательной реполяризации), заключительная стадия которой, помимо I_{Kr} и I_{Ks} , обеспечивается фоновым калиевым током входящего выпрямления I_{K1} . Этот ток также вносит основной вклад в поддержание у рабочих кардиомиоцитов стабильного потенциала покоя (фаза 4) на уровне около -80 мВ, поэтому в пейсмекерных миоцитах, способных к спонтанной деполяризации, I_{K1} отсутствует или имеет небольшую величину.

Основные отличия в ионных механизмах формирования ПД в кардиомиоцитах эктотермных позвоночных от таковых у млекопитающих проиллюстрированы на рис. 1Б (более подробное описание представлено в ранее опубликованном обзоре [9]).

1. I_{Na} у большинства изученных эктотермных позвоночных выражен слабее, чем у млекопитающих и птиц, которым необходима большая скорость проведения возбуждения в миокарде в связи со значительно более высокой ЧСС.

2. Калиевые токи с быстрой кинетикой активации, I_{to} и I_{Kur} , отсутствуют в кардиомиоцитах всех исследованных на данный момент эктотермных позвоночных. В связи с этим, фаза первичной реполяризации ПД у них либо отсутствует полностью, либо, в тех случаях, когда миоцит имеет достаточно большой по амплитуде I_{Na} , возникает за счет инактивации I_{Na} , но выражена слабо.

3. Основной реполяризующий ток, найденный в кардиомиоцитах у всех изученных в этом отношении эктотермных позвоночных, — I_{Kr} . В то же время I_{Ks} , выполняющий у млекопитающих роль реполяризационного резерва, то есть подстраховки реполяризации на случай ослабле-

ния I_{Kr} или резкого усиления I_{CaL} при воздействии симпатических нервов или адреналина, был обнаружен лишь у трех видов эктотермных животных: лягушки-быка (*Rana catesbeiana*), зебра-данио (*Danio rerio*) и золотого карася (*Carassius carassius*). У двух последних видов I_{Ks} имеет намного меньшую плотность и быструю кинетику активации по сравнению с I_{Ks} в кардиомиоцитах млекопитающих, что обусловлено отсутствием сопряжения порообразующих субъединиц каналов $K_{v7.1}$ с регуляторными субъединицами $minK$.

4. Наконец, ток I_{K1} выражен в кардиомиоцитах эктотермных позвоночных в целом слабее, чем у эндотермных. Последние более требовательны к защите сердца от эктопической автоматической активности, которой способствует высокая температура тела.

Таким образом, к основным ионным токам, формирующим электрическую активность в рабочих кардиомиоцитах эктотермных позвоночных, можно отнести I_{Na} , I_{Kr} , I_{CaL} и I_{K1} . Именно они и подвергаются изменениям в ходе сезонной акклиматизации, что будет более подробно рассмотрено ниже.

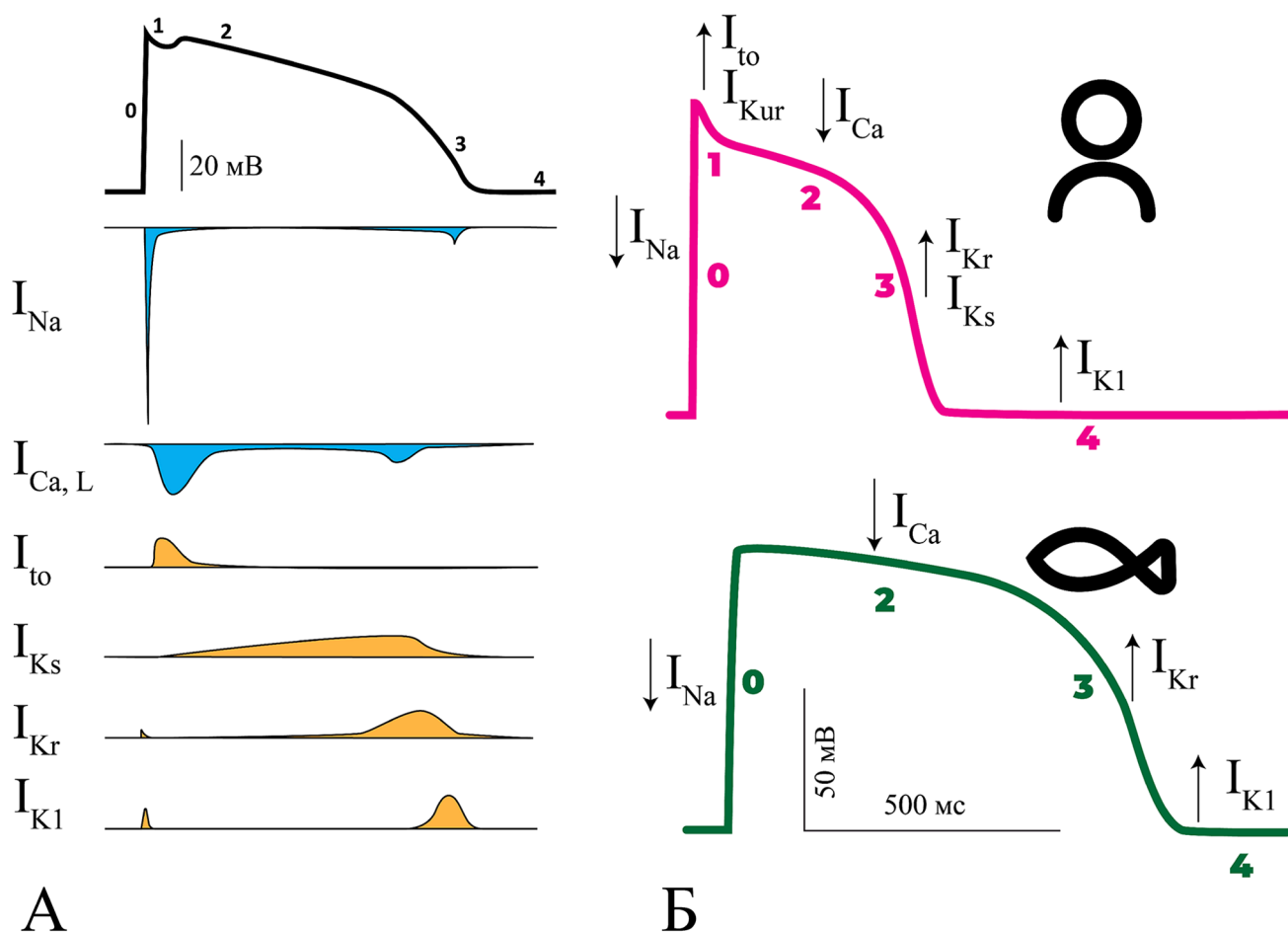


Рис. 1. Ионные механизмы электрической активности в рабочих кардиомиоцитах. А — соотношение между пятью фазами потенциала действия (ПД) и основными ионными токами в желудочковом миоците человека, Б — сравнение набора ионных токов в рабочем миоците человека (I_{Kur} представлен только в предсердных миоцитах) и рыбы.

Изменения ионных токов и электрической активности сердца при остром снижении температуры на примере костистых рыб

Частота сердцебиений

Одним из наиболее важных для сердечной деятельности параметров является ЧСС, зависящая от частоты генерации ПД клетками сердечного пейсмекера, параметров проведения волны возбуждения по сердцу и воздействий вегетативной нервной системы и гуморальных регуляторов на генерацию и проведение возбуждения. ЧСС увеличивается при увеличении температуры среды, а значит и температуры эктотермного организма. При этом зависимость ЧСС от температуры имеет нелинейный характер (рис. 2А): при более высоких температурах температурный коэффициент Q_{10} (коэффициент, показывающий изменение параметра при повышении температуры на 10°C) выше, чем при более низких, и находится в диапазоне от 1,3 до 3 [10]. Однако такая зависимость наблюдается только в определенном, специфичном для каждого вида животных, физиологическом диапазоне температур. Повышение температуры выше верхней границы этого диапазона не оказывает негативного воздействия на генерацию возбуждения пейсмекерными миоцитами, но приводит к нарушению проведения возбуждения по сердцу, главным образом в области атриовентрикулярного соединения, и, как следствие, к резкому снижению

ЧСС [11, 12]. Температура, при достижении которой прекращается рост ЧСС, называется температурой переходной точки (breakpoint temperature). Она зависит не только от вида животного, составляя, к примеру, около 15°C для кумжи (*Salmo trutta*) и $28,5^{\circ}\text{C}$ для летней плотвы (*Rutilus rutilus*), но и непосредственно от условий окружающей среды, снижаясь как при зимней акклиматизации, так и при холодовой акклимации в лабораторных условиях [12]. Механизм нарушения проведения при чрезмерном повышении температуры основан на снижении возбудимости желудочковых миоцитов, в свою очередь обусловленном уменьшением I_{Na} при продолжающемся при нагревании росте I_{K1} [13–15]. Более подробно он рассмотрен в обзоре профессора Матти Ворнанена [16].

У костистых рыб пейсмекер сердца расположен в основании клапана между венозным синусом и предсердием (синоатриальный клапан) и имеет кольцевидную форму [17]. Эксперименты на одиночных миоцитах, энзиматически выделенных из области синоатриального клапана и способных к спонтанной генерации ПД [11], показали, что частота генерации ПД пейсмекерными миоцитами напрямую зависит от температуры (рис. 2Б). Следует отметить, что сердечный ритм генерируется не одиночными миоцитами, а всей пейсмекерной структурой, функциональные характеристики которой у рыб остаются практически неизученными, но, очевидно, могут отличаться

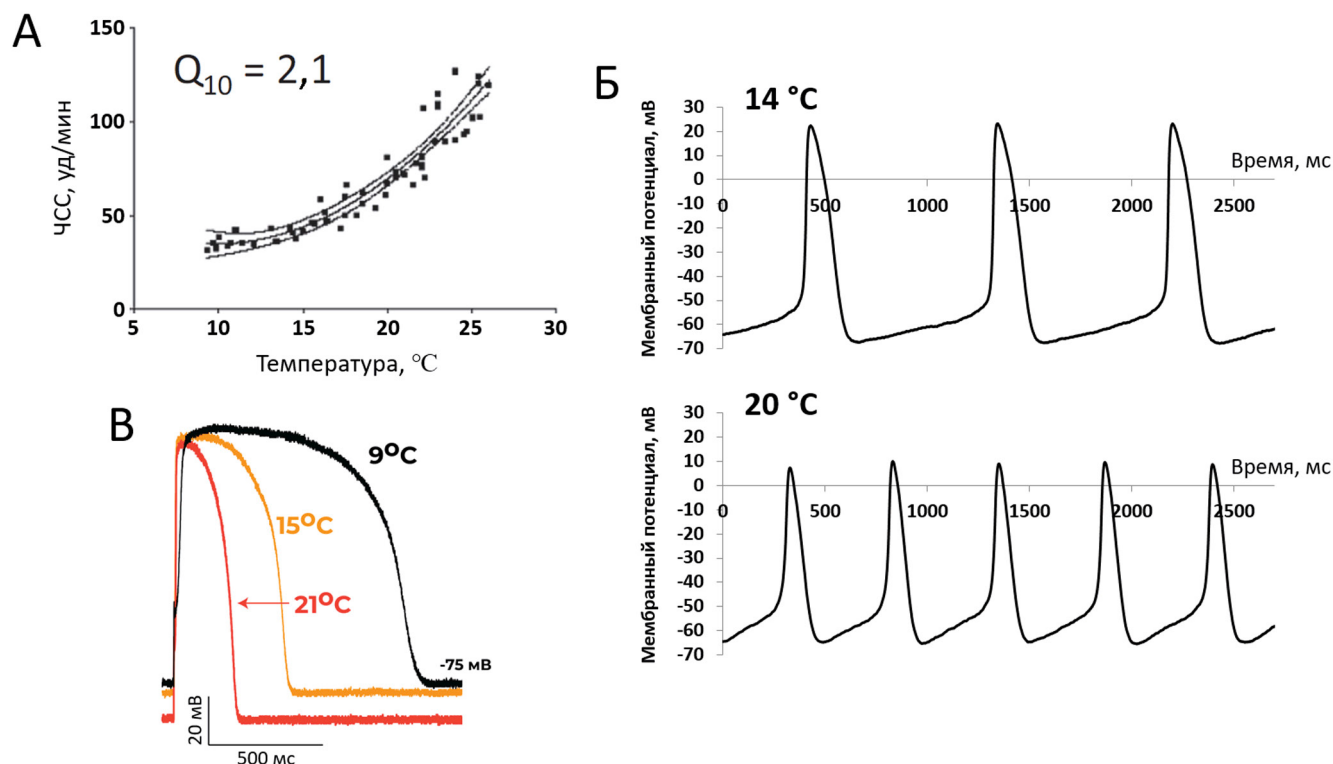


Рис. 2. Эффекты острого изменения температуры. А – зависимость ЧСС у кумжи от температуры воды (из статьи Гамперль [10] с разрешения издательства Elsevier). Б – сравнение оригинальных записей электрической активности в пейсмекерном миоците, выделенном из синоатриального соединения кумжи, при температуре 14°C и 20°C (из [11] с изменениями). В – сравнение оригинальных записей ПД желудочковом миоците наваги при 9°C , 15°C , 21°C (собственные данные).

от свойств отдельных миоцитов. Кроме того, в организме пейсмейкер сердца находится под постоянным воздействием холинергических и адренергических нейронов, а также циркулирующего в крови адреналина и других гуморальных регуляторов. В остром эксперименте снижение температуры приводит к увеличению адренергических воздействий на сердце и снижению холинергического тонуса, что очевидным образом частично компенсирует эффект замедления активности пейсмейкерных миоцитов при снижении температуры [10]. За счет этого рыбам удается поддерживать приемлемую ЧСС при остром охлаждении, к примеру, при пересечении термоклина.

Ионные механизмы замедления активности пейсмейкерных клеток при снижении температуры остаются фактически неисследованными, главным образом по причине отсутствия работ, раскрывающих механизм автоматии пейсмейкерных миоцитов рыб и других эктотермных позвоночных. Показано, что так называемый пейсмейкерный ток I_f имеет в миоцитах, выделенных из синоатриального соединения сердца кумжи, плотность менее 0,8 пА/пФ при потенциале -120 мВ (для сравнения: в пейсмейкерных миоцитах мыши — $18 \pm 1,9$ пА/пФ [18], кролика — 10 ± 1 пА/пФ [19]), причем блокирование I_f ионами Cs^+ вызывает лишь незначительное замедление ритма в препарате изолированного пейсмейкера сердца кумжи [20]. Вероятно, роль I_f в поддержании автоматии в пейсмейкерных клетках эктотермных позвоночных невелика, однако экспериментальные данные, убедительно показывающие роль механизма кальциевых часов [21] в этом процессе, также отсутствуют.

Потенциал покоя и конфигурация ПД

В целом ряде исследований, проведенных главным образом на кардиомиоцитах рыб, было показано, что все ионные токи, формирующие электрическую активность рабочего миокарда, уменьшаются при снижении температуры и увеличиваются при нагревании до определенного предела. Характер температурной зависимости, однако, различается для разных токов. В экспериментах на желудочковых миоцитах плотвы было показано, что I_{K1} имеет положительную зависимость от температуры, близкую к линейной, в диапазоне от 4 до 41°C, с Q10 равным 1,39 [22]. Как следствие, уменьшение температуры вызывает деполяризацию (рис. 2В), а повышение — гиперполяризацию потенциала покоя в кардиомиоцитах [15, 22, 23]. Ток I_{Kr} в миоцитах плотвы также прямо зависит от температуры, но в более узком диапазоне — от 4 до 32°C. При более сильном нагревании I_{Kr} начинает уменьшаться. Температурный коэффициент Q10 для I_{Kr} намного выше, чем для I_{K1} , — 1,9 [22]. Основные следствия температурной зависимости I_{Kr} — замедление реполяризации, то есть увеличение длительности ПД при снижении

температуры в остром эксперименте (рис. 2В) и, соответственно, ускорение реполяризации при нагревании [22–24].

Более сложная, колоколообразная, температурная зависимость (рис. 3) характерна для I_{Na} [11, 25]. К примеру, в предсердных миоцитах летней плотвы I_{Na} увеличивается при нагревании до 23,8°C (при этом Q10 составляет 2,3), но дальнейшее нагревание приводит к прогрессирующему снижению амплитуды I_{Na} [13]. Как и в случае ЧСС, температура переходной точки для I_{Na} зависит от вида животного (данио-рерио — 26,6°C, плотва — 23,8°C, форель — 18,3°C) и температурных условий его обитания (холодовая акклимация у плотвы снижает температуру переходной точки I_{Na} на 3,5°C). В работе, проведенной на миоцитах нескольких видов рыб (карась, форель, налим), было показано, что параметры кривых стационарной активации и инактивации не меняются существенно при изменении температуры в остром эксперименте [26], в то время как у гетеротермных млекопитающих (якутский суслик) известен эффект сдвига кривых вправо при охлаждении [27]. За счет снижения амплитуды I_{Na} охлаждение вызывает уменьшение скорости деполяризации (скорости нарастания переднего фронта ПД) в рабочих кардиомиоцитах [15, 24], а значит и скорости проведения возбуждения по миокарду.

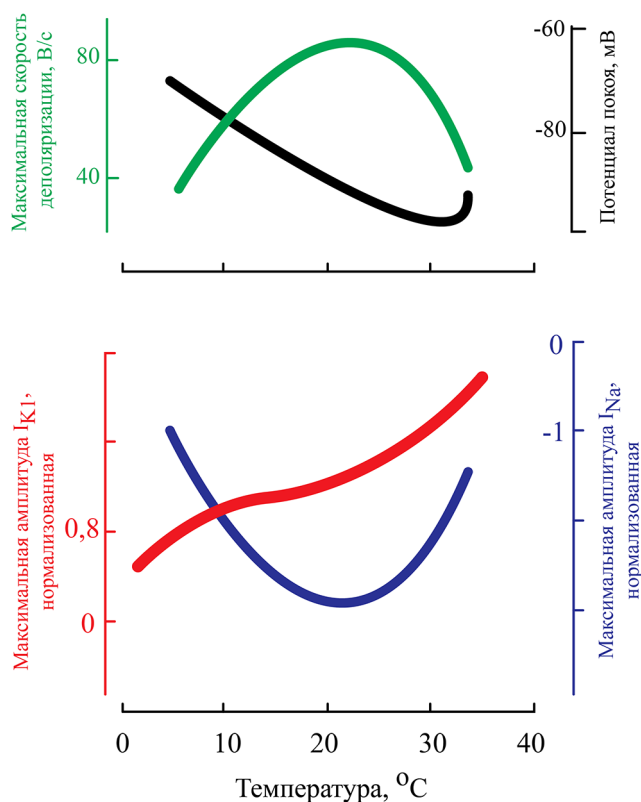


Рис. 3. Зависимости параметров электрической активности (сверху) и токов, определяющих возбудимость кардиомиоцитов (снизу) от температуры окружающей среды (рисунок составлен по данным Бадр и соавт. [12–14]).

Температурные зависимости I_{Na} и I_{K1} имеют решающее значение для сохранения возбудимости кардиомиоцитов эктотермных животных при нагревании или охлаждении. Как охлаждение, так и нагревание за пределами диапазона оптимальных температур ведут к подавлению возбудимости миоцитов. В первом случае это обусловлено как непосредственно зависимым от температуры уменьшением I_{Na} , так и деполяризацией мембраны, приводящей к инактивации натриевых каналов и дополнительно снижающей I_{Na} . Во втором случае уменьшение I_{Na} при нагреве свыше температуры переходной точки вкупе с продолжающимся при нагревании ростом I_{K1} и гиперполяризацией приводит к сдвигу баланса деполяризующих и гиперполяризующих токов в пользу последних и невозможности возбуждения кардиомиоцита [13–15].

Ток I_{CaL} (по I_{CaT} данных на сегодняшний день нет) имеет прямую зависимость от температуры в широком диапазоне температур. Для I_{CaL} в желудочковых миоцитах летней плотвы Q10 составил 2,4. При этом ток увеличивался при нагревании почти до 30°C и только при большей температуре начинал уменьшаться [13]. Важно отметить, что количестве входящего в кардиомиоцит Ca^{2+} зависит не только от амплитуды I_{CaL} как такового, но и от времени, в течение которого ток идет, зависящего от длительности ПД. При охлаждении амплитуда I_{CaL} снижается, но за счет замедления реполяризации растет длительность входа Ca^{2+} в клетку. В итоге, несмотря на замедление как нарастания, так и спада кальциевого транзистента, его амплитуда в некоторых случаях может даже увеличиваться при снижении температуры [28]. У эндотермных животных чувствительность миофиламентов к Ca^{2+} снижается при охлаждении, что ведет к снижению силы сокращений миоцитов. Однако по крайней мере у рыб данный эффект в значительной степени компенсируется исходно намного более высокой чувствительностью миофиламентов, обусловленной более высоким родством сердечной изоформы тропонина С к Ca^{2+} [2, 29]. Таким образом, кардиомиоциты рыб имеют ряд механизмов, позволяющих частично компенсировать негативное действие снижения температуры на сократимость кардиомиоцитов.

Итак, острое снижение температуры вызывает замедление сердечного ритма, деполяризацию потенциала покоя, увеличение длительности ПД в рабочем миокарде, замедление проведения возбуждения по миокарду, снижение возбудимости кардиомиоцитов и умеренное ослабление их сократительной активности. При этом, если снижение ЧСС и ослабление сокращений миоцитов можно компенсировать в краткосрочной временной перспективе за счет усиления адренергических влияний на сердце, то проблемы удлинения рефрактерного периода и снижения синхронности активации рабочего миокарда, обусловленного за-

медлением проведения, адренергическое воздействие не решает. Таким образом, острое снижение температуры неизбежно приводит к более или менее выраженному снижению производительности сердца. Это представляет проблему для животных, сохраняющих высокий уровень активности в зимнее время, поэтому для них характерен целый комплекс адаптивных изменений ионных токов и электрической активности сердца, развивающихся при наступлении зимы.

Механизмы сезонной акклиматизации электрической активности сердца на примере рыб

Компенсаторные изменения автоматической способности пейсмекера сердца

Впервые электрическая активность в изолированных пейсмекерных кардиомиоцитах рыбы, выделенных из области синоатриального клапана, была зарегистрирована в экспериментах, проведенных на форели, прошедшей акклимацию в течение 1 мес. при 4°C (холодная акклимация – ХА) или 18°C (теплая акклимация – ТА) [30]. При температуре акклимации пейсмекерные миоциты ХА-форели генерировали возбуждение с частотой в 2,5 раза ниже, чем миоциты ТА-форели. Однако сравнение электрической активности в двух группах миоцитов при одинаковой температуре (температура сравнения) 11°C показало, что автоматическая способность ХА-миоцитов существенно выше: частота ПД составила $50,6 \pm 0,9$ мин⁻¹ против $40,7 \pm 1,5$ мин⁻¹ в миоцитах из ТА-форели (рис. 4А). Таким образом, холодовая акклимация даже относительно небольшой длительности приводит к усилению автоматической способности пейсмекерных клеток, что позволяет частично компенсировать замедление ритма, вызванное охлаждением на прямую. Остается невыясненным, связано ли это с увеличением экспрессии HCN3 или HCN4, наиболее сильно экспрессируемых в области синоатриального клапана изоформ каналов тока, активируемого гиперполяризацией I_f [20].

Изменения реполяризующих токов, длительности ПД и уровня потенциала покоя

В большинстве случаев как зимняя акклиматизация в природе, так и холодовая акклимация в лабораторных условиях вызывают изменения, позволяющие компенсировать прямые эффекты снижения температуры, описанные выше (замедление реполяризации ПД и деполяризацию потенциала покоя). В этой связи, адаптивные изменения токов I_{Kr} и I_{K1} критически важны для обеспечения нормального функционирования сердца эктотермных животных в зимний период.

Наибольшее количество данных, причем хорошо согласующихся между собой, было получено для I_{Kr} . У ХА-форели (4°C), проходившей аккли-

мацию в течение месяца, плотность I_{Kr} , измеренного в предсердных миоцитах при температуре сравнения (10°C), составила $5,1 \pm 0,6$ пА/пФ, что в 2,5 раза больше, чем у ТА-форели (17°C) ($1,9 \pm 0,2$ пА/пФ) [31]. Еще большая разница в плотности I_{Kr} наблюдалась в желудочковых миоцитах ХА- и ТА-форели [32]. Причина заключается в значительном увеличении экспрессии каналов $K_{V11.2}$ форели (omERG) при холодовой акклимации, приводящей к уравниванию совокупной проводимости данных каналов в кардиомиоцитах двух групп форели даже при сравнении в условиях соответствующих температур акклимации (т.е. 4 и 17°C) [33]. Как следствие, длительность ПД в желудочковых миоцитах ТА-форели, измеренная на уровне 90% реполяризации, при температуре сравнения на 20% превосходила таковую в миоцитах ХА-рыб [31]. Аналогичное увеличение I_{Kr} при холодовой акклимации в лабораторных условиях в течение месяца было показано в предсердных кардиомиоцитах карася (*Carassius carassius*), плотвы (*Rutilus rutilus*), налима (*Lota lota*) и окуня (*Perca fluviatilis*), а также в желудочковых миоцитах карася, плотвы и налима [32]. Отметим,

что в том же исследовании холодовая акклимация не вызвала прироста I_{Kr} в кардиомиоцитах щуки (*Esox lucius*). Практически у всех перечисленных видов рыб длительность ПД при температуре сравнения 11°C была меньше в случае холодовой акклимации [32].

Данные по изменению параметров I_{Kr} при зимней акклиматизации в естественных условиях были получены в серии исследований, проведенных нашим коллективом на Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова. У наваги (*Eleginus nawaga*) зимой наблюдается почти двукратное увеличение I_{Kr} (рис. 4В) в желудочковых миоцитах [34]. При этом длительность желудочковых ПД у летней наваги почти в 2 раза превосходила таковую у зимней при температуре сравнения 6°C (рис. 4Б), а при температурах акклимации (12°C и 3°C соответственно) существенно не различалась у двух групп животных [35]. Таким образом, у зимней наваги происходит полная компенсация вызванного охлаждением удлинения ПД, в том числе за счет многократного увеличения экспрессии гена каналов enERG (ген *Kcnh6*) [36] и, следовательно, плотности I_{Kr} . Еще более яркие

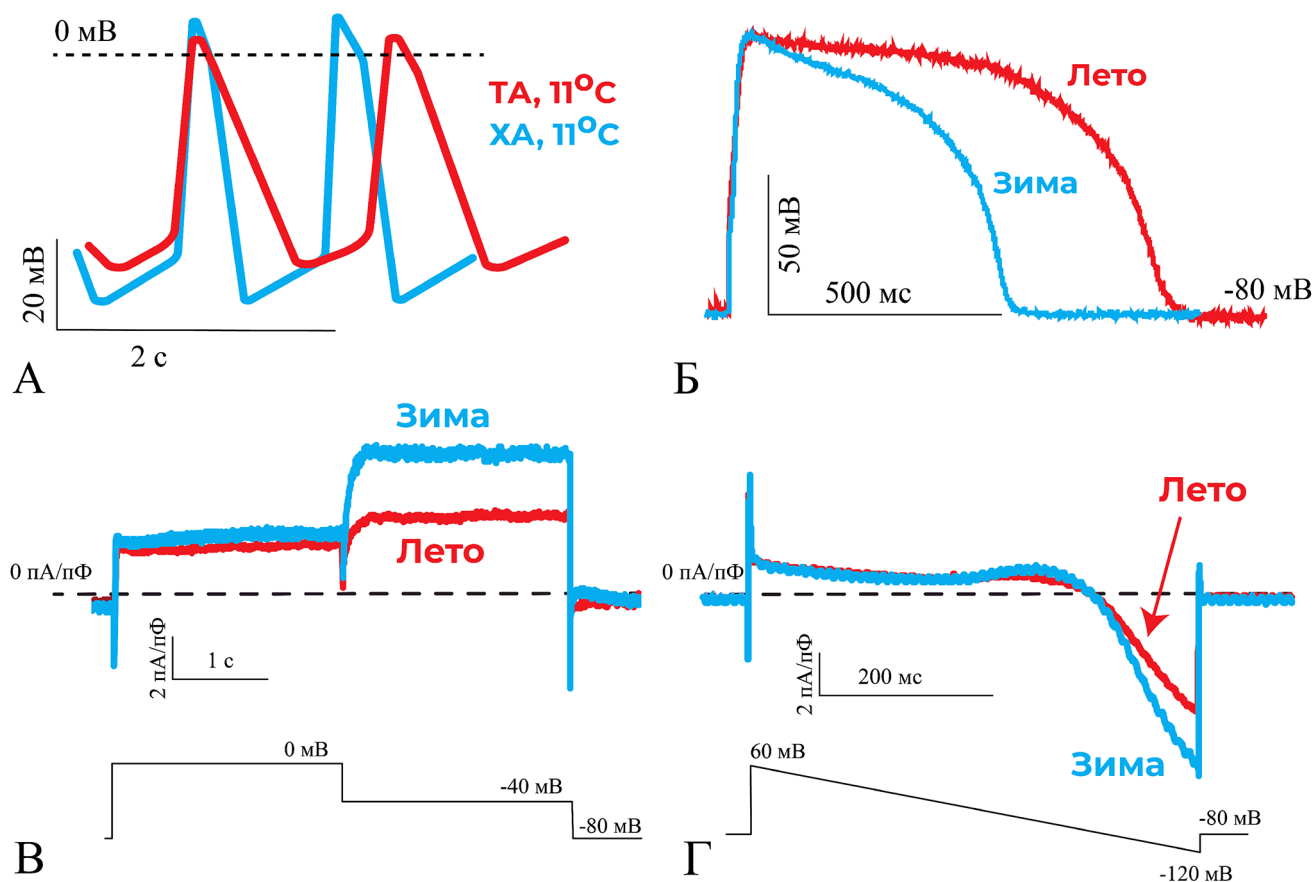


Рис. 4. Изменения электрической активности и ионных токов в кардиомиоцитах рыб при долговременной адаптации к низким температурам. **А** – конфигурация ПД при температуре 11°C в пейсмерных миоцитах радужной форели, выделенных из сердца ТА- и ХА-форели (18°C и 4°C соответственно), рисунок составлен по данным статьи Хаверинена и Ворнанена [30]. **Б** – конфигурация ПД в желудочковых миоцитах летней и зимней наваги при температуре сравнения 6°C . **В**, **Г** – токи I_{Kr} (**В**) и I_{K1} (**Г**), индуцированные изменением потенциала по представленным ниже схемам, в желудочковых миоцитах летней и зимней наваги при температуре сравнения 6°C .

изменения зимняя акклиматизация вызывала в кардиомиоцитах европейского керчака (*Muchocephalus scorpio*). В желудочковых миоцитах зимнего керчака плотность I_{Kr} была в 4,5 раза выше, чем у летнего, а длительность ПД при 2°C была значительно меньше, чем при 12°C в миоцитах летней рыбы [6]. Это исследование остается единственным, где было напрямую сопоставлено воздействие зимней акклиматизации в природе и акклиматизации летних животных при 2°C в течение 1,5 мес. В последнем случае наблюдалось лишь двукратное увеличение плотности I_{Kr} в желудочковых миоцитах и значительно менее выраженное, чем у зимней рыбы укорочение ПД. Эти данные, а также сравнение результатов, полученных на отловленных зимой морских рыбах (керчак и навага) и подвергнутых холодовой акклиматизации пресноводных рыбах (см. выше) позволяют предположить, что комплекс факторов окружающей среды, изменяющихся при наступлении зимы, вызывает более выраженные адаптивные перестройки электрофизиологических характеристик кардиомиоцитов, чем одно лишь снижение температуры [6]. Более того, в работе, проведенной на желудочковых миоцитах даллии (Alaskan blackfish, *Dallia pectoralis*), живущей в мелких тундряных озерах и сталкивающейся в течение зимы с выраженной гипоксией, было прямо показано, что холодовая акклиматизация вообще не вызывает увеличения I_{Kr} в миоцитах этого вида рыб и лишь сочетание холода с гипоксией индуцирует достоверную сверхэкспрессию каналов $K_{v11.2}$ и рост I_{Kr} [37].

Влияние холодовой акклиматизации на медленный ток задержанного выпрямления I_{Ks} было исследовано лишь в одной работе, проведенной на карасе. Месячная ХА не приводила к существенным изменениям как экспрессии гена порообразующей субъединицы $K_{v7.1}$, так и плотности тока I_{Ks} в предсердных и желудочковых миоцитах [38].

Увеличение плотности I_{K1} при наступлении зимы также может помочь в обеспечении компенсации вызванного снижением температуры замедления реполяризации, поскольку I_{K1} вносит вклад в заключительный этап фазы 3 ПД. Вторая важная роль адаптивного усиления I_{K1} — предотвращение излишней деполяризации потенциала покоя, вызванной снижением температуры. В экспериментах с лабораторной холодовой акклиматизацией пресноводных рыб было показано усиление выходящей компоненты I_{K1} в желудочковых миоцитах ХА-карася, налима, плотвы и окуня, а также в предсердных миоцитах ХА-карася и плотвы. У форели и щуки ХА не приводила к усилению I_{K1} ни в желудочковых, ни в предсердных миоцитах [32]. У даллии ХА вызывает увеличение плотности I_{K1} , причем, в отличие от I_{Kr} , даже в отсутствие гипоксии. Гипоксия усиливает этот эффект, что сопровождается сверхэкспрессией каналов $K_{ir2.2}$ и $K_{ir2.4}$ [37]. У керчака зимняя акклиматизация

приводила к увеличению выходящего I_{K1} как в желудочковых, так и в предсердных миоцитах, в то время как полуторамесячная холодовая акклиматизация не вызывала усиления I_{K1} [6]. У наваги зимняя акклиматизация также вызывала выраженное увеличение I_{K1} как в желудочковых (рис. 4Г), так и в предсердных миоцитах [35]. Наконец, эксперименты с зимней плотвой показали несколько меньшую плотность I_{K1} по сравнению с этим показателем у летних животных [22], хотя упомянутые эксперименты с ХА-плотвой показывали увеличение тока [32].

Таким образом, за счет усиления реполяризующих токов I_{Kr} и I_{K1} при долговременной адаптации к снижению температуры окружающей среды, в миокарде рыб реализуется частичная компенсация прямых эффектов снижения температуры, а именно замедления реполяризации рабочих кардиомиоцитов и деполяризации потенциала покоя, что обеспечивает возможность повышения ЧСС в случае необходимости и поддерживает возбудимость миокарда.

Изменения быстрого натриевого тока

Как отмечалось выше, прямое действие низких температур на натриевые каналы, а также их инактивация за счет деполяризации потенциала покоя приводят к снижению I_{Na} и, как следствие, к замедлению проведения возбуждения. Можно предположить, что в число адаптаций кардиомиоцитов при наступлении зимы входит и увеличение пиковой амплитуды I_{Na} . Именно такой эффект был продемонстрирован у форели в условиях холодовой акклиматизации в лаборатории [26]. В той же работе у карася, напротив, наблюдали снижение амплитуды I_{Na} в условиях ХА. При этом, у ХА-форели отмечалась значительно более быстрая кинетика инактивации I_{Na} , чем у ТА-форели, что, по всей видимости, нивелирует увеличение пикового I_{Na} . Зимняя акклиматизация в естественных условиях у плотвы приводила к выраженному увеличению амплитуды I_{Na} [13]. С другой стороны, у керчака наблюдался обратный эффект — уменьшение I_{Na} , которое лишь отчасти воспроизводилось ХА в лабораторных условиях [6]. Наконец, у зимней наваги амплитуда I_{Na} в желудочковых миоцитах не отличалась значимо от таковой у летней наваги [34]. Казалось бы, закономерность сезонных изменений амплитуды I_{Na} отсутствует, однако, сопоставление этих фактов с данными по сезонным изменениям I_{K1} у перечисленных видов рыб позволяет предположить, что изменение I_{Na} противоположно изменению I_{K1} . То есть у видов, для которых характерно снижение I_{K1} (зимняя плотва, ХА-форель), наблюдается увеличение I_{Na} . И напротив, у ХА-карася, зимней наваги и керчака I_{K1} увеличивается по сравнению с ТА/летними животными, в то время как амплитуда I_{Na} снижается (карась, керчак) или

остается без изменений (навага). Физиологический смысл этой взаимосвязи заключается в том, что увеличение I_{K1} при адаптации к низкой температуре позволяет стабилизировать негативный потенциал покоя и не допустить инактивации натриевых каналов, поэтому усиление I_{Na} в такой ситуации не нужно. Снижение I_{K1} напротив приводит к деполяризации потенциала покоя при пониженных температурах, что инактивирует часть натриевых каналов. В такой ситуации необходимо увеличение их экспрессии для сохранения нормальной возбудимости кардиомиоцитов.

Следует также отметить, что у всех изученных в этом отношении видов наблюдаются однонаправленные изменения стационарной активации и инактивации I_{Na} . У форели, карася и наваги ХА или зимняя акклиматизация приводила к сдвигу кривых активации и инактивации влево [26, 34]. У зимнего керчака сдвиг влево показан только для кривой активации I_{Na} [6]. Сдвиг кривой активации влево помогает повысить возбудимость миоцитов, поскольку для активации I_{Na} в таком случае требуется меньшая степень деполяризации мембраны.

Изменения кальциевого тока и сократительной активности миокарда

Кальциевые токи представлены в рабочих кардиомиоцитах у большинства изученных видов эктотермных животных в основном током I_{CaL} . По сезонным изменениям I_{CaT} , который может достигать существенной амплитуды у данио-рерио [39] и осетра *Acipenser baerii* [40], данные отсутствуют. Ясности в отношении сезонных изменений I_{CaL} пока также нет в связи с небольшим количеством изученных видов. Холодовая акклиматизация не приводила к существенным изменениям амплитуды I_{CaL} в желудочковых миоцитах форели и карася [41]. Зимняя акклиматизация приводит к разнонаправленным изменениям I_{CaL} у видов, изученных в этом отношении. У наваги [34] и карася [42] было зафиксировано снижение амплитуды I_{CaL} в зимнее время. Напротив, у керчака зимой амплитуда I_{CaL} была в несколько раз выше, чем у летних животных — как в желудочковых, так и в предсердных кардиомиоцитах [6]. Таким образом, предположение о том, что I_{CaL} снижается у видов, ведущих зимой неактивный образ жизни (карась), опровергается данными, полученными на наваге, для которой характерно активное питание и нерест в зимнее время, а также дальии.

Изменения электрической активности других эктотермных позвоночных при холодовой адаптации

Систематического исследования изменений ионных токов при ХА или зимней акклиматизации у амфибий не проводилось. В имеющейся работе, выполненной на травяной лягушке (*Rana temporaria*), показано увеличение как фонового

тока входящего выпрямления I_{K1} , так и, в особенности, ацетилхолинзависимого тока входящего выпрямления I_{KACH} в желудочковых и предсердных миоцитах зимних лягушек по сравнению с летними животными [43]. В более детальном исследовании, проведенном на красноухих черепахах (*Trachemys scripta*), способных некоторое время зимовать в прудах в условиях гипоксии, показано, что ХА при 5°C приводит к почти двукратному уменьшению I_{CaL} (при температуре сравнения 11°C) в желудочковых миоцитах по сравнению с животными, прошедшими акклиматизацию при температуре 21°C [44]. Важно отметить, что, как и у костистых рыб, у красноухих черепах было обнаружено противоположное действие ХА на I_{Na} и I_{K1} : в то время как ХА приводила к выраженному усилению I_{K1} , для I_{Na} наблюдалась тенденция к снижению. В отличие от рыб, у рептилий I_{Kr} играет минорную роль в реполяризации по сравнению с I_{K1} [45–47]. По-видимому, в связи с этим изменений I_{Kr} при ХА у красноухих черепах зафиксировано не было [44].

Заключение

Итак, эктотермные позвоночные способны к целому ряду адаптивных изменений ионных токов кардиомиоцитов, развивающихся при переходе к холодному времени года. Эти изменения в целом противонаправлены эффектам острого снижения температуры окружающей среды и поэтому позволяют, по крайней мере частично, компенсировать изменения, непосредственно вызванные снижением температуры. Наиболее универсальным адаптивным изменением является ускорение реполяризации за счет увеличения экспрессии калиевых каналов K_{v11} и увеличения тока I_{Kr} , компенсирующее замедление реполяризации, непосредственно индуцируемое охлаждением. Поскольку возбудимость кардиомиоцитов критически зависит от соотношения величин деполяризующего I_{Na} и реполяризующего I_{K1} , адаптивные изменения этих токов находятся в тесной взаимосвязи: у видов, для которых характерно снижение плотности I_{K1} в зимнее время, происходит увеличение I_{Na} , и наоборот. Важным адаптивным изменением служит увеличение автоматической способности пейсмекерных кардиомиоцитов при долговременном снижении температуры, однако ионные механизмы этого явления до сих пор не выяснены, что открывает перспективы для дальнейших исследований в данной области.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №24-75-00018. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ivanov K.P. Physiological blocking of the mechanisms of cold death: theoretical and experimental considerations. *J. Therm. Biol.* 2000;25(6):467–479.
2. Gillis T.E., Marshall C.R., Xue X.-H., Borgford T.J., Tibbits G.F. Ca^{2+} binding to cardiac troponin C: effects of temperature and pH on mammalian and salmonid isoforms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279(5):R1707–R1715.
3. Keen A.N., Klaiman J.M., Shiels H.A., Gillis T.E. Temperature-induced cardiac remodeling in fish. *J. Exp. Biol.* 2017;220(2):147–160.
4. Gamperl A.K., Farrell A.P. Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J. Exp. Biol.* 2004;207(15):2539–2550.
5. Aho E., Vornanen M. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 1999;202(19):2663–2677.
6. Filatova T.S., Abramochkin D.V., Shiels H.A. Thermal acclimation and seasonal acclimatization: a comparative study of cardiac response to prolonged temperature change in shorthorn sculpin. *J. Exp. Biol.* 2019;222(16):jeb.202242.
7. Brouillette J., Clark R.B., Giles W.R., Fiset C. Functional properties of K^{+} currents in adult mouse ventricular myocytes. *J. Physiol.* 2004;559(3):777–798.
8. Huo R., Sheng Y., Guo W.-T., Dong D.-L. The potential role of $\text{Kv}4.3$ K^{+} channel in heart hypertrophy. *Channels.* 2014;8(3):203–209.
9. Abramochkin D.V., Filatova T.S., Pustovit K.B., Voronina Y.A., Kuzmin V.S., Vornanen M. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2022;268:111204.
10. Gamperl A.K. Integrated Responses of the Circulatory System to Temperature. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Ed. A.P. Farrell. L.: Elsevier; 2011:1197–1205.
11. Haverinen J., Abramochkin D.V., Kamkin A., Vornanen M. Maximum heart rate in brown trout (*Salmo trutta fario*) is not limited by firing rate of pacemaker cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017;312(2):R165–R171.
12. Badr A., El-Sayed M.F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on temperature-dependence of cardiac excitability in the roach, *Rutilus rutilus*. *J. Exp. Biol.* 2016;219(10):1495–1504.
13. Badr A., Korajoki H., Abu-Amra E.-S., El-Sayed M.F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on thermal tolerance of inward currents in roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes. *J. Comp. Physiol. B.* 2018;188(2):255–269.
14. Badr A., Abu-Amra E.-S., El-Sayed M.F., Vornanen M. Electrical excitability of roach (*Rutilus rutilus*) ventricular myocytes: effects of extracellular K^{+} , temperature, and pacing frequency. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2018;315(2):R303–R311.
15. Abramochkin D.V., Haverinen J., Mitenkov Y.A., Vornanen M. Temperature- and external K^{+} -dependence of electrical excitation in ventricular myocytes of cod-like fishes. *J. Exp. Biol.* 2019;222(5):jeb.193607.
16. Vornanen M. The temperature dependence of electrical excitability in fish hearts. *J. Exp. Biol.* 2016;219(13):1941–1952.
17. Lukyanov A.N., Sukhova G.S., Udel'nov M.G. Localization structural and functional organization of cardiac pacemaker in the cod *Gadus morhua*. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 1983;19:231–236.
18. Mangoni M. Properties of the hyperpolarization-activated current (If) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc. Res.* 2001;52(1):51–64.
19. Wilders R., Verheijck E.E., Kumar R., Goolsby W.N., Van Ginneken A.C., Joyner R.W., Jongsma H.J. Model clamp and its application to synchronization of rabbit sinoatrial node cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1996;271(5):H2168–H2182.
20. Hassinen M., Haverinen J., Vornanen M. Small functional I_f current in sinoatrial pacemaker cells of the brown trout (*Salmo trutta fario*) heart despite strong expression of HCN channel transcripts. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017;313(6):R711–R722.
21. Donald L., Lakatta E.G. What makes the sinoatrial node tick? A question not for the faint of heart. *Phil. Trans R Soc. B.* 2023;378(1879):20220180.
22. Badr A., Hassinen M., El-Sayed M.F., Vornanen M. Effects of seasonal acclimatization on action potentials and sarcolemmal K^{+} currents in roach (*Rutilus rutilus*) cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2017;205:15–27.
23. Paajanen V., Vornanen M. Regulation of action potential duration under acute heat stress by $I_{\text{K,ATP}}$ and I_{K1} in fish cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;286(2):R405–R415.
24. Abramochkin D.V., Shamshura A., Dzhumaniiazova I., Pustovit O.B., Mishchenko A.A. High temperature and hyperkalemia increase vulnerability of navaga cod (*Eleginus nawaga*) cardiomyocytes to the ecotoxicant 3-methyl-phenanthrene. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2025;299:111761.
25. Haverinen J., Dzhumaniiazova I., Abramochkin D.V., Hassinen M., Vornanen M. Effects of Na^{+} channel isoforms and cellular environment on temperature tolerance of cardiac Na^{+} current in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 2021;224(8):jeb241067.
26. Haverinen J., Vornanen M. Temperature acclimation modifies Na^{+} current in fish cardiac myocytes. *J. Exp. Biol.* 2004;207(16):2823–2833.
27. Filatova T.S., Kuzmin V.S., Guskova V.O., Abramochkin D.V. Sodium current preserves electrical excitability in the heart of hibernating ground squirrel (*Citellus undulatus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2023;282:111452.
28. Shiels H.A., Vornanen M., Farrell A.P. Effects of temperature on intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in trout atrial myocytes. *J. Exp. Biol.* 2002;205(23):3641–3650.
29. Churcott C.S., Moyes C.D., Bressler B.H., Baldwin K.M., Tibbits G.F. Temperature and pH effects on Ca^{2+} sensitivity of cardiac myofibrils: a comparison of trout with mammals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1994;267(1):R62–R70.
30. Haverinen J., Vornanen M. Temperature acclimation modifies sinoatrial pacemaker mechanism of the rainbow trout heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292(2):R1023–R1032.
31. Vornanen M., Ryökkynen A., Nurmi A. Temperature-dependent expression of sarcolemmal K^{+} currents in

rainbow trout atrial and ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002;282(4):R1191–R1199.

32. Haverinen J., Vornanen M. Responses of action potential and K⁺ currents to temperature acclimation in fish hearts: Phylogeny or thermal preferences? *Physiol. Biochem. Zool.* 2009;82(5):468–482.

33. Hassinen M., Haverinen J., Vornanen M. Electrophysiological properties and expression of the delayed rectifier potassium (ERG) channels in the heart of thermally acclimated rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008;295(1):R297–R308.

34. Dzhumaniazova I., Filatova T.S., Shamshura A., Abramochkin D.V., Shiels H.A. Seasonal remodelling of the fish heart alters sensitivity to petrochemical pollutant, 3-methylphenanthrene. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2024;288:110082.

35. Abramochkin D.V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac potassium currents (IK1 and IKr) in an arctic marine teleost, the navaga cod (*Eleginus navaga*). *J. Comp. Physiol. B.* 2015;185(8):883–890.

36. Hassinen M., Abramochkin D.V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac action potential in the Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*, Gadidae). *J. Comp. Physiol. B.* 2014;184(3):319–327.

37. Stecyk J.A.W., Couturier C.S., Abramochkin D.V., Hall D., Arrant-Howell A., Kubly K.L., Lockmann Sh., Logue K., Trueblood L., Swalling C., Pinard J., Vogt A. Cardiophysiological responses of the air-breathing Alaska blackfish to cold acclimation and chronic hypoxic submergence at 5°C. *J. Exp. Biol.* 2020;223(22):jeb225730.

38. Hassinen M., Laulaja S., Paajanen V., Haverinen J., Vornanen M. Thermal adaptation of the crucian carp (*Carassius carassius*) cardiac delayed rectifier current, I_{Ks} , by homomeric assembly of K_v 7.1 subunits without MinK. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011;301(1):R255–R265.

39. Haverinen J., Hassinen M., Dash S.N., Vornanen M. Expression of calcium channel transcripts in the ze-

brafish heart: dominance of T-type channels. *J. Exp. Biol.* 2018;221(10):jeb179226.

40. Haworth T.E., Haverinen J., Shiels H.A., Vornanen M. Electrical excitability of the heart in a Chondrostei fish, the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014;307(9):R1157–R1166.

41. Vornanen M. L-Type Ca²⁺ current in fish cardiac myocytes: Effects of thermal acclimation and β -adrenergic stimulation. *J. Exp. Biol.* 1998;201(4):533–547.

42. Vornanen M., Paajanen V. Seasonality of dihydropyridine receptor binding in the heart of an anoxia-tolerant vertebrate, the crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;287(5):R1263–R1269.

43. Abramochkin D., Kuzmin V. Electrophysiological differences in cholinergic signaling between the hearts of summer and winter frogs (*Rana temporaria*). *J. Comp. Physiol. B.* 2018;188(4):649–656.

44. Stecyk J.A.W., Paajanen V., Farrell A.P., Vornanen M. Effect of temperature and prolonged anoxia exposure on electrophysiological properties of the turtle (*Trachemys scripta*) heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;293(1):R421–R437.

45. Galli G.L.J., Warren D.E., Shiels H.A. Ca²⁺ cycling in cardiomyocytes from a high-performance reptile, the varanid lizard (*Varanus exanthematicus*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009;297(6):R1636–R1644.

46. Abramochkin D.V., Matchkov V., Wang T. A characterization of the electrophysiological properties of the cardiomyocytes from ventricle, atrium and sinus venosus of the snake heart. *J. Comp. Physiol. B.* 2020;190(1):63–73.

47. Abramochkin D.V., Kuzmin V.S., Matchkov V., Kamensky A.A., Wang T. The snake heart pacemaker is localized near the sinoatrial valve. *J. Exp. Biol.* 2021;224(16):jeb242778.

Поступила в редакцию 24.03.2025

После доработки 30.04.2025

Принята в печать 05.05.2025

REVIEW

Adaptive seasonal changes in cardiac electrical activity of ectothermic vertebrates

D.V. Abramochkin^{*} , I. Dzhumaniazova , O.B. Pustovit , T.S. Filatova 

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

^{*}e-mail: abram340@mail.ru

One of the problems which ectothermic animals have to face during the fall of the ambient temperature is the negative change in parameters of the cardiac electrical activity leading to the decrease in the cardiac output. This is crucially important for those ectotherms which remain highly active during the cold season. The present review discusses the known physiological mechanisms which allow the ectothermic vertebrates, primarily various fish species, to reduce at least partially the cold-induced changes of cardiac electrical activity and to maintain the functional capacity of the heart at sufficient level for the active life during the winter. These mechanisms include the increase of density and/or changes in steady-state activation and inactivation parameters of ionic currents in cardiac myocytes. The acute temperature-dependent changes in ionic currents and electrical activity are also discussed, including the temperature effects on the excitability of cardiac myocytes.

Keywords: *cardiomyocytes, action potential, ionic currents, ectotherms, temperature, ion channels*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 24-75-00018.

Сведения об авторах

Абрамочкин Денис Валерьевич — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-929-937-66-50; e-mail: abram340@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>

Джуманиязова Ирина Хамрабековна — мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: dzhumaniiiazova.irina.2019@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5167-2112>

Пустовит Оксана Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5137-2187>

Филатова Татьяна Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: filka1994@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1911>

ОБЗОР



УДК 616-006.6+616-002.2+616.34-006.6

Роль гипоксии и транскрипционных факторов HIF в развитии язвенного колита и ассоциированного с ним колоректального рака

М.В. Силина^{*} , Д.Ш. Джалилова , О.В. Макарова

Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Россия, 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

^{*}*e-mail: marusyasilina99@yandex.ru*

Одним из факторов, способствующих развитию колоректального рака, является воспаление. Хронический язвенный колит может быть причиной развития ассоциированного с ним колоректального рака (Colitis-Associated Colorectal cancer, SAC) в 1,6–3,7% случаев. Основным регулятором клеточного ответа на воспаление является белок NF- κ B, который за счет наличия сайта связывания в соответствующем гене, индуцирует экспрессию и синтез транскрипционного фактора HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1 α). Окислительный стресс, возникающий в ходе воспалительного процесса, зачастую приводит к возникновению мутаций в клетках. ДНК быстро пролиферирующих эпителиальных клеток толстой кишки становится мишенью для активных форм кислорода, что в итоге приводит к инициации и прогрессии опухолей. Темпы развития SAC во многом зависят от исходной устойчивости организма к гипоксии. У животных с низкой устойчивостью к гипоксии отмечаются более быстрые темпы инициации и прогрессии SAC по сравнению с высокоустойчивыми особями, что характеризуется более высокой частотой развития аденокарцином, высокими уровнями экспрессии генов *Hif3a*, *Vegf*, *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*, *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, *Muc1* и *Cldn7* в опухолях, выраженными изменениями гематологических показателей и дисбалансом субпопуляций лимфоцитов в опухолях, брыжечных лимфоузлах и крови. Понимание механизмов взаимосвязи устойчивости к гипоксии, активности HIF, особенностей течения хронических воспалительных и опухолевых процессов необходимо для разработки новых подходов к персонализированной терапии заболеваний, сопровождающихся недостатком кислорода.

Ключевые слова: колоректальный рак, язвенный колит, устойчивость к гипоксии, HIF, воспаление, воспалительные заболевания кишечника

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-5

Введение

Хроническое воспаление является одной из причин развития примерно 20% всех злокачественных опухолей [1]. В 1863 г. Рудольф Вирхов впервые обнаружил «лимфоретикулярный инфильтрат» вокруг опухоли и высказал мысль о связи хронического воспаления с ее возникновением (цитируется по Корнилюк и соавт. [2]). В настоящее время данные многочисленных исследований о роли воспалительного микроокружения в развитии злокачественных опухолей подтверждают гипотезу Вирхова и являются основой для разработки новых подходов к профилактике, прогнозированию течения и лечению опухолевых заболеваний [2, 3]. Показано, что инициировать опухолевый рост может и сам хронический воспалительный процесс. Так, например, в печени при вирусных гепатитах В и С он является основным фактором риска развития гепатоцеллюлярной кар-

циномы, а инфекция *Helicobacter pylori* и связанное с ней хроническое воспаление – рака желудка [4]. Известно, что колит-ассоциированный колоректальный рак (Colitis-Associated Colorectal cancer, SAC) развивается в результате дисплазии эпителия на фоне хронического воспаления у пациентов с хроническим язвенным колитом (ХЯК), при этом частота его возникновения у таких больных составляет 1,6–3,7% [5]. Риск развития SAC зависит от длительности течения ХЯК [6] и увеличивается примерно на 1% в год [7, 8]. Среднее время от постановки диагноза ХЯК до SAC составляет 17 лет, при этом у 21% пациентов опухоли развиваются в течение 10 лет после начала заболевания [9].

Основным регулятором, реализующим воспалительные процессы, является ядерный фактор каппа В (NF- κ B). Активация этого транскрипционного фактора происходит в результате последовательного фосфорилирования ряда молекул,

которое инициируется взаимодействием паттерн-распознающих рецепторов со специфическим лигандом [10]. Далее NF- κ B транслоцируется из цитоплазмы в ядро и активирует экспрессию зависимых генов, кодирующих провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α и др.), хемокины, белки острой фазы воспаления и ряд других молекул [11]. В последние годы появляется все больше данных о взаимосвязи NF- κ B и транскрипционных факторов семейства HIF (Hypoxia-Inducible Factor), которые регулируют клеточный ответ на гипоксию. Известно, что NF- κ B непосредственно влияет на экспрессию и содержание белка HIF-1 α как в условиях нормоксии, так и при гипоксии, что объясняется наличием сайта связывания NF- κ B в проксимальной части промотора гена *HIF1A* [12–14]. Кроме того, в экспериментальных исследованиях на различных клеточных линиях человека и животных показано, что ингибиторы NF- κ B и HIF-1 α оказывают противовоспалительное и антиоксидантное действие на опухолевые клетки, в связи с чем эти молекулы могут быть потенциальными мишенями для терапии колоректального рака [15–17].

Показано, что существуют индивидуальные различия реакции организма на гипоксическое воздействие, во многом обусловленные разным уровнем экспрессии гена и содержания белка HIF [18–20]. В экспериментах лабораторные животные с разной устойчивостью к гипоксии отличаются по тяжести течения ряда воспалительных заболеваний – в частности, системного воспалительного ответа, острого и хронического язвенного колита (ЯК) [21–26], а также опухолевых процессов [27–30]. В этом обзоре систематизированы данные о роли HIF и клеточного ответа на гипоксию в развитии хронического колита и САС во взаимосвязи с исходной устойчивостью организма к недостатку кислорода.

Роль воспаления в развитии колит-ассоциированного колоректального рака

Хроническое воспаление характеризуется сочетанием повреждения тканей, лимфоцитарно-макрофагальной воспалительной инфильтрации и активацией пролиферативных процессов. В очаг воспаления мигрируют макрофаги, лимфоциты и нейтрофилы, которые продуцируют провоспалительные цитокины и активные формы кислорода (АФК). Под действием синтезируемых опухолеассоциированными макрофагами (Tumor-Associated Macrophages, TAM) провоспалительных цитокинов, в пролиферирующих клетках возникают повреждения ДНК [31]. Это приводит к возникновению точечных мутаций, делеций или перестроек в различных генах, изменению активности кодируемых ими белков, постоянной активации сигнальных каскадов и, как следствие, к высокой пролиферативной активности клеток и быстрой прогрессии

опухоли [32]. Известно, что NF- κ B является одним из индукторов экспрессии антиапоптогических генов, кодирующих белки семейства Bcl-2 (Bcl-2 и Bcl-xL), а также ингибиторы апоптоза IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins; cIAP1, cIAP2, XIAP и c-FLIP) [33]. Это обеспечивает выживание активно пролиферирующих опухолевых клеток и является одним из лимитирующих событий в процессе прогрессии большинства типов опухолей. В то же время эпителиальные клетки толстой кишки обновляются каждые 4–7 сут, что свидетельствует об их высокой пролиферативной активности в физиологических условиях [34]. Поэтому при САС пролиферация опухолевых клеток не является лимитирующим событием прогрессии, а ключевую роль играют иммунные клетки и продуцируемые ими цитокины [35–38].

Микроокружение опухоли состоит из клеток стромы, кровеносных сосудов и различных иммунных клеток, таких как Т-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы, NK-клетки и В-лимфоциты [37–39]. Основным компонентом инфильтрата, ассоциированного с опухолью, являются TAM [40]. Один из источников TAM – моноциты периферической крови, положительный хемотаксис которых в опухоль обеспечивает их поверхностный рецептор CCR2 (C-C motif Chemokine Receptor 2), взаимодействующий с белком CCL2 (C-C motif Chemokine Ligand 2) в опухолевых клетках [41]. TAM могут оказывать цитотоксическое влияние на опухолевые клетки и вызывать альтеративные изменения в тканях. В то же время эти клетки продуцируют факторы роста (PDGF, CSF-1 и др.) и ангиогенеза (VEGF), что может стимулировать пролиферацию опухолевых клеток, способствовать образованию кровеносных сосудов, инвазии и метастазированию [42].

На экспериментальных моделях САС и гепатоцеллюлярной карциномы было показано, что развитие и прогрессия этих опухолей во многом зависят от уровня продукции ряда провоспалительных цитокинов, в том числе TNF- α и IL-6, которые способствуют пролиферации клеток при этих процессах [35, 36, 43].

Цитокин TNF- α играет важную роль в пролиферации, дифференцировке клеток и регуляции клеточного цикла. С одной стороны, TNF- α может быть эндогенным промотором опухоли, поскольку он стимулирует рост, пролиферацию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток, а также ангиогенез. Показано, что TNF- α активирует зависимые от протеинкиназы C α (Protein kinase C α , PKC α) и белка AP-1 (Activating Protein-1) сигнальные пути, что приводит к индукции экспрессии генов, кодирующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) и матриксные металлопротеиназы MMP-9 и MMP-3 [44]. В свою

очередь, эти молекулы стимулируют транскрипцию гена *CTGF* (*Connective Tissue Growth Factor*), регулирующего миграцию опухолевых клеток и рост опухоли [45]. В эксперименте на клетках глиомы U251 продемонстрировано, что TNF- α индуцирует экспрессию различных ангиогенных факторов, включая *VEGF*, *IL-8* и *HGF* (*Hepatocyte Growth Factor*) [46, 47]. С другой стороны, TNF- α активирует инфильтрирующие опухоль цитотоксические Т-лимфоциты (Cytotoxic T-lymphocytes, CTL), которые оказывают цитолитическое действие на опухолевые клетки, что позволяет рассматривать этот цитокин в качестве возможного терапевтического агента [48]. Точные механизмы регуляции про- и противоопухолевой активности TNF- α в настоящее время остаются недостаточно изученными, во многом в связи с использованием в исследованиях опухолей различных гистогенетических типов. Увеличение содержания этого цитокина, часто в сочетании с IL-1 β и IL-6 и GM-CSF, наблюдается в опухолевых и стромальных клетках у человека при колоректальном раке (КРР), а также при раке яичников, молочной железы, простаты, мочевого пузыря, лимфомах и лейкозах [49].

IL-6 играет важную роль в регуляции иммунного ответа и воспаления. Он продуцируется как неопухолевыми клетками, так и клетками разных типов опухолей — КРР, рака молочной железы, простаты и яичников. Этот провоспалительный цитокин также регулирует в опухолевых клетках апоптоз, пролиферацию, миграцию и инвазию, ангиогенез и метастазирование [50]. По данным литературы, IL-6 взаимодействует с собственным рецептором на поверхности клеток, что приводит к фосфорилированию фактора транскрипции STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), который индуцирует экспрессию ключевых генов клеточного цикла, таких как *CCND1* (*Cyclin D1*) [51, 52], для перехода фаз от G1 к S. Важно отметить, что IL-6 активирует фактор STAT3 не только в опухолевых клетках, но и в макрофагах, стимулируя продукцию IL-10, а также в CTL, способствуя апоптозу клеток опухоли [53].

Помимо провоспалительных цитокинов и иммунных клеток важную роль в развитии САС играют генетические и эпигенетические изменения, такие как мутации, гиперметилирование и изменения экспрессии некоторых микроРНК, причем эти изменения возникают еще до появления каких-либо гистологических признаков дисплазии или опухолевого роста [54]. Известно, что в ходе прогрессии КРР возникают последовательные мутации в генах-супрессорах *TP53*, *APC*, *IDH1*, *Rb* и *ARID1A* и протоонкогенах *K-ras*, *C-src*, *C-myc* и *PIK3CA*, однако порядок этих мутаций различается при спорадическом КРР и САС. Так, спорадический подтип характеризуется последовательностью «Vogelgram» *APC-KRAS-P53*,

а САС — «обратная Vogelgram» [55], что свидетельствует о различиях в патогенезе разных форм КРР на молекулярном уровне.

По мере прогрессии опухоли плотность метилирования CpG-островков увеличивается в опухолевых клетках по сравнению с нормальными [56]. Показано, что гены *APBA1* (*Amyloid beta Precursor protein Binding family A member 1*) и *MYOD* (*Myoblast Determination Protein*), а также и промоторные области генов *EYA4* (*Eyes Absent transcriptional coactivator and phosphatase 4*) и *ESR1* (*Estrogen Receptor 1*) гиперметилированы у пациентов с САС [57].

МикроРНК, которые являются некодирующими РНК длиной от 19 до 25 нуклеотидов, регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Показано, что у пациентов с САС в опухолях возрастают уровни экспрессии miR-18a, miR-19a, miR-21, miR-26b, miR-31, miR-155 и miR-214 и снижаются — miR-124, miR-193a-3p и miR-139-5p по сравнению с неопухолевыми тканями [58].

Таким образом, на развитие САС влияют хроническое воспаление и реакции иммунного ответа, мутации, возникающие в генах, регулирующих клеточный цикл, и эпигенетические изменения.

HIFs и хронический язвенный колит

В развитии воспаления ключевую роль играет локальная гипоксия, возникающая из-за микроциркуляторных нарушений и индуцирующая продукцию многих цитокинов и хемокинов. В то же время, нарушение их продукции является одним из основных физиологических различий между опухолевыми и неопухолевыми, воспалительными, иммунными и стромальными клетками. В последние десятилетия интенсивно изучается роль транскрипционных факторов семейства HIF в развитии воспаления, инициации и прогрессии опухоли.

Транскрипционные факторы семейства HIF, представленные тремя изоформами α -субъединицы — HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α — и белком HIF-1 β , являются ключевыми молекулами, регулирующими клеточный ответ на гипоксию. В условиях нормоксии субъединицы HIF-1 α и HIF-2 α гидроксилируются пролилгидроксилазами PHDs (PHD1, PHD2, PHD3) и аспарагинилгидроксилазой FIH (Factor Inhibiting HIF) и подвергаются 26S-протеасомной деградации при участии белка онкосупрессора фон Гиппеля–Линдау (von Hippel–Lindau protein, pVHL) [59, 60]. При недостатке кислорода гидроксилирования не происходит, поэтому α -субъединицы транслируются в ядро клетки, где, образуя комплекс с HIF-1 β , активируют экспрессию генов-мишеней [59, 61, 62]. HIF-3 α является недостаточно изученной изоформой и имеет несколько разных сплайс-вариантов [63]. На культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека показано, что

в условиях острой гипоксии HIF-3 α медленно накапливается в клетке, а при длительном недостатке кислорода его содержание увеличивается и остается на высоком уровне не менее 48 ч [64]. Кроме того, субъединицы HIF-1 α , HIF-2 α и HIF-3 α отличаются по своей структуре, локализации в тканях, зависимым генам и времени экспрессии в зависимости от длительности гипоксического воздействия [65].

Главными сенсорами кислорода в клетках являются PHDs и FIH. Известно, что PHDs обладают низким сродством к O₂, а FIH — высоким [66]. Так, в ответ на любое снижение уровня кислорода, в первую очередь, изменяется ферментативная активность PHDs, что приводит к стабилизации α -субъединицы белка HIF. В свою очередь, активность FIH снижается только при выраженном дефиците кислорода, что в совокупности с эффектом PHDs позволяет контролировать адаптацию организма к недостатку кислорода при гипоксии разной тяжести на уровне, необходимом для конкретных условий окружающей среды [67].

В условиях недостатка кислорода происходит инактивация PHD1, что приводит к увеличению активности β -киназы I κ B (IKK β), деградации ингибитора α -субъединицы NF- κ B (I κ B α) и повышению экспрессии *NFKB* [68]. Далее белок NF- κ B транслоцируется в ядро, где, взаимодействуя с сайтом связывания в гене *HIF1A*, кодирующем транскрипционный фактор HIF-1 α , увеличивает его экспрессию [12]. В последующем происходит транскрипция генов, индуцируемых гипоксией, а также некоторых генов, кодирующих провоспалительные белки, в том числе различные цитокины.

Помимо NF- κ B-зависимой индукции HIF-1 α , при воспалении его функциональная активация также осуществляется АФК и провоспалительными цитокинами [69]. Согласно представленному в литературе регуляторному механизму, АФК окисляют Fe²⁺, необходимое для функционирования PHDs, что приводит к нарушению гидроксилирования HIF-1 α и его стабилизации [70]. Шарма и соавт. на клеточных линиях глиобластом A172, U87MG и T98G показали, что IL-1 β индуцирует экспрессию гена и синтез белка HIF-1 α [71]. Этот цитокин взаимодействует с собственным рецептором, активирует сигнальный каскад Myd88-Ras-Akt/ERK, что приводит к активации экспрессии *HIF1A* [71]. Также экспрессию гена и синтез белка HIF-1 α через путь PI3K/Akt может индуцировать и TNF- α [72].

Следует отметить, что условия активации HIF-1 α (гипоксия или воспаление) напрямую влияют на эффект, который эта субъединица вызывает [73]. В условиях недостатка кислорода наблюдается усиление транскрипции генов, отвечающих за адаптацию организма к гипоксии, а при воспалении — генов, регулирующих воспалитель-

ный ответ [74]. Установлено, что при воспалении с выраженными системными проявлениями, в том числе при сепсисе, активация HIF-1 α может играть негативную роль. При моделировании липополисахарид-индуцированного системного воспалительного ответа на мышах, дефицитных по HIF-1 α , была показана более высокая выживаемость и меньшее повреждение тканей, сопровождающееся снижением содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и повышением противовоспалительных [75]. При тяжелом течении системного воспалительного ответа усиление продукции провоспалительных молекул приводит к повышению проницаемости сосудов и свертываемости крови с последующим развитием синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, полиорганной недостаточности и летальным исходом. Провоспалительная роль HIF-1 α была продемонстрирована в исследовании пациентов, имеющих высокий риск развития послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений. Показано, что эта группа пациентов характеризуется высоким содержанием белка HIF-1 α в сыворотке крови до операции, а также через 24 и 72 ч после нее и высоким уровнем экспрессии *HIF1A* в лейкоцитах через 72 ч после оперативного вмешательства [76]. В то же время в экспериментальных исследованиях в разных типах клеток в очагах инфекционного воспаления выявлена противовоспалительная роль активации HIF-1 α . Так, на моделях колита, индуцированного 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой и оксазолоном, было продемонстрировано более тяжелое течение заболевания у мышей с нокаутом *Hif1a* в эпителиальных клетках толстой кишки [77]. При изучении терапевтической активности ингибиторов гидроксилаз PHDs на модели ЯК, индуцированного декстрансульфатом натрия (ДСН), было показано, что два из них — диметил-оксалилглицин (Dimethyloxallyl Glycine, DMOG) и FG-4497, снижают активность воспаления, что подтверждает противовоспалительную функцию HIF-1 α [78]. Также показано, что HIF-1 α стимулирует продукцию фактора трилистника TFF3 (Trefol Factor 3), муцинов и β -дефензинов эпителиальными клетками, что повышает защитные свойства эпителиального барьера толстой кишки при ХЯК [79].

Известно, что при ХЯК в слизистой оболочке кишки возникают метаболические и микроциркуляторные нарушения, что приводит к гипоксии и стабилизации белков HIF [80, 81]. Показано, что HIF-1 α активирует клетки иммунной системы — Th17 и CTL (клетки CD8+), а также клетки миелоидного ряда — нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и макрофаги. Активированные путем HIF-зависимого увеличения экспрессии ROR γ t (RAR(Retinoic Acid Receptor)-Related Orphan Receptor gamma T) и ингибирования

Foxp3 [82], Th17-лимфоциты продуцируют IL-17, который активирует Th1-тип иммунного ответа и продукцию IFN γ . Далее IFN γ оказывает стимулирующее действие на макрофаги, которые начинают синтезировать провоспалительные цитокины и способствуют развитию воспаления [83]. В то же время, HIF-зависимая активация CTL приводит к усилению противовирусной и противоопухолевой функции этих клеток [84], а индукция экспрессии и синтеза провоспалительного цитокина IL-33, регулирующего функцию Th2, в эпителиальных клетках толстой кишки влияет на незрелые лимфоидные клетки, которые снижают выраженность воспаления амфирегулин-зависимым путем [85]. Амфирегулин является лигандом рецептора эпидермального фактора роста EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), активация сигнального каскада которого приводит к усилению продукции муцинов, необходимых для поддержания функции кишечного барьера [86].

При ДСН-индуцированном колите у мышей с нокаутом *Hif1a* в миелоидных клетках воспалительный процесс был менее выраженным по сравнению с таковым у животных дикого типа [87]. Полученные результаты авторы объясняют снижением хемотаксической активности миелоидных клеток при нокауте *Hif1a*, что было также продемонстрировано ранее [88, 89]. В другом исследовании показано, что нокаут *Hif1a* в дендритных клетках у мышей приводит к тяжелому течению острого ЯК, коррелирующему с высоким уровнем провоспалительных цитокинов и повышением продукции муцина [90]. В свою очередь, роль HIF-2 α и HIF-3 α в развитии ХЯК недостаточно изучена. Согласно литературным данным, HIF-2 α путем связывания с элементами, отвечающими на гипоксию (Hypoxia-Response Elements, HREs), в промоторе соответствующего гена активирует синтез хемокина CXCL1 (Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1) и таким образом способствует рекрутированию нейтрофилов в очаг воспаления [91]. Также белок HIF-2 α индуцирует синтез IL-6 макрофагами [92], способствуя более тяжелому течению воспаления в толстой кишке и индукции опухолевого роста.

Таким образом, данные о роли HIF-1 α в развитии воспаления толстой кишки противоречивы. Известно, что организмы имеют разную устойчивость к гипоксии [18, 21, 93–99]. Возможно, противоречивость данных можно связать с тем, что в перечисленных выше работах не была проведена оценка исходной устойчивости к недостатку кислорода, хотя известно, что активность белков, участвующих в адаптации к гипоксии (HIF-1 α , VEGF и др.), различается у высоко- и низкоустойчивых организмов. Наличие взаимосвязи между клеточными ответами на гипоксию и воспаление [68, 81, 100], которые играют ключевые роли в онкогенезе, также позволяет вы-

двинуть гипотезу о влиянии исходной устойчивости организма к недостатку кислорода на развитие и прогрессию опухолей, развивающихся при хроническом воспалении.

HIFs и колит-ассоциированный колоректальный рак

При прогрессии опухоли и достижении размера более 400 мкм [101, 102] быстро пролиферирующие клетки на ее периферии потребляют доступный кислород, что ограничивает его диффузию в глубокие слои и приводит к возникновению гипоксической среды. Опухолевые клетки, характеризующиеся высокой скоростью метаболизма и потребления кислорода, также влияют и на клетки перитуморальной зоны. В прилегающих к опухоли тканях наблюдается изменение функционального состояния клеток, характеризующееся увеличением интенсивности одних клеточных процессов (организация везикул и их переход из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи, слияние и деление митохондрий, клеточное дыхание и катаболизм органических молекул) и подавлением других (передача сигналов апоптоза, рост и клеточный цикл) [103]. Изменение биоэнергетики клеток опухоли и ее микроокружения, связанное с формированием гипоксических условий, приводит к активации сигнальных путей транскрипционных факторов HIF, что способствует прогрессии опухоли, а также может быть одной из причин резистентности к терапии [66, 104–107] (рисунок).

Изменения экспрессии и содержания изоформ HIF- α , а также их генов-мишеней были выявлены при различных опухолевых заболеваниях. Так, высокую экспрессию гена *HIF1A* и содержание белка HIF-1 α обнаружили в опухолях при раке эндометрия и яичников, мочевого пузыря, головного мозга, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, легких, ротоглотки, поджелудочной железы, кожи, желудка и щитовидной железы [104, 108–111], а его мишеней – переносчика глюкозы GLUT1 и фактора роста эндотелия сосудов VEGF – при плоскоклеточном раке легких [112] и светлоклеточном раке почек [113]. В свою очередь, увеличение экспрессии *EPAS1* и содержания HIF-2 α было отмечено в опухоли и ее строме при плоскоклеточном раке полости рта, карциноме почки, немелкоклеточном раке легкого, гемангиобластоме мозжечка и аденокарциноме желудка [114–116]. Следует отметить, что при нокауте гена, кодирующего белок HIF-1 α , как было показано в экспериментах на клеточных линиях и лабораторных животных, HIF-2 α становится основным регулятором клеточного ответа на гипоксию, способствует прогрессии опухолей и повышает иммуносупрессивный ответ клеток [117, 118]. В условиях гипоксии в опухолевой ткани HIF-1 α и HIF-2 α связываются с HREs в генах *CD274*

и *PDCD1LG2* (Programmed cell death 1 ligand 2) и индуцируют синтез кодируемых ими белков PD-L1 и PD-L2 (Programmed cell Death Ligand 1 и 2) соответственно [119]. Эти белки локализуются на мембране не только опухолевых клеток, но и TAM, и взаимодействуют с PD-1 (Programmed cell Death 1) на поверхности CTL, тем самым ингибируя активность этих клеток и вызывая иммуносупрессию опухолевого микроокружения [117]. Однако при исследовании образцов папиллярной карциномы щитовидной железы было показано, что более высокая экспрессия мРНК *EPAS1* в тканях опухоли положительно коррелирует с инфильтрацией CTL и отрицательно — с уровнем экспрессии гена *CD274*, в связи с чем в данном эксперименте активность HIF-2 α была охарактеризована как противоопухолевая [120]. Вероятно, эти противоречивые результаты обусловлены молекулярно-биологическими различиями гистогенетических типов опухолей, исследованных в этих работах, а также с их гетерогенным клеточным составом. Более того, органы, как и организмы, различаются по устойчивости к гипоксии [121], что также влияет на результаты исследований роли HIF в онкогенезе.

Роль изоформы HIF-3 α в развитии опухолевых заболеваний наименее изучена, однако существующие немногочисленные данные свидетельствуют о супрессорном эффекте этой изоформы

в отличие от HIF-1 α и HIF-2 α . Так, на клеточных линиях опухолей человека (клетки светлоклеточного рака почки человека 786-О, клетки остеосаркомы U2OS и эмбриональные клетки почечного эпителия HEK293A) показано, что сплайс-вариант HIF3 α 4 образует комплекс с HIF-2 α и препятствует активации зависимых от него генов, что отражает его супрессорную активность в отношении опухолевых клеток [122]. В более поздней работе продемонстрирована взаимосвязь HIF-1 α и HIF-3 α посредством действия ключевой микроРНК клеточного ответа на гипоксию miR-210 [123]. В ходе эксперимента на клеточных линиях холангиокарциномы человека KKKU-213, KKKU-055 и KKKU-100 было показано, что miR-210, активируемая HIF-1 α , подавляет трансляцию белка HIF-3 α путем взаимодействия с соответствующим сайтом связывания в 3'-нетранслируемой области *HIF3A* [123]. Однако исследования роли HIF-3 α в процессе онкогенеза в биопсийных образцах человека или *in vivo* в опухолях экспериментальных животных в процессе онкогенеза в настоящее время в литературе немногочисленны.

Таким образом, в процессе развития злокачественных опухолей может наблюдаться увеличение как экспрессии мРНК, так и содержания белков HIF-1 α и HIF-2 α , а также их генов-мишеней, в то время как о динамике таковых изменений HIF-3 α литературных данных недостаточно.

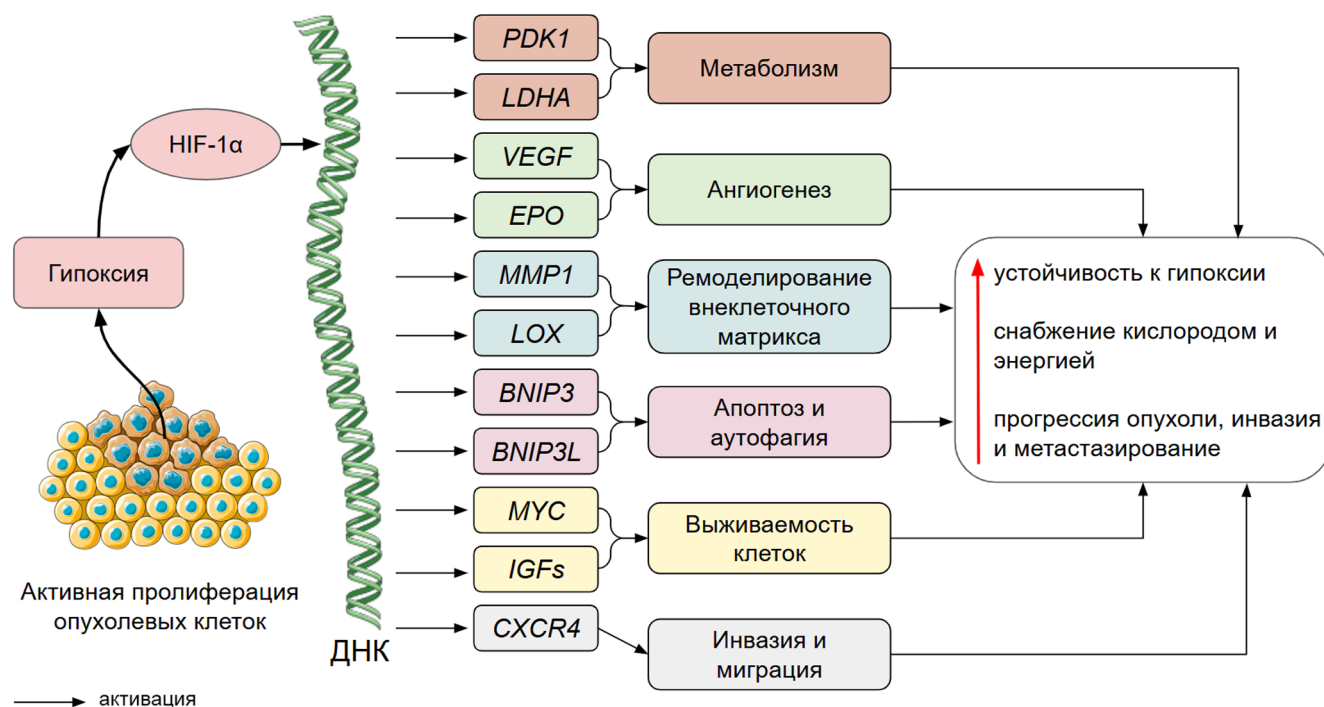


Рисунок. Роль HIF-1 α в регуляции ключевых процессов онкогенеза. HIF-1 α — α субъединица фактора, индуцируемого гипоксией, 1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha); *PDK1* — 3-фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1); *LDHA* — лактатдегидрогеназа А (lactate dehydrogenase); *VEGF* — фактор роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor); *EPO* — эритропоэтин; *MMP1* — металлопротеиназа 1; *LOX* — липооксигеназа; *BNIP3* — BCL2/аденовирус E1B 19 кДа-белок-взаимодействующий белок 3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3); *BNIP3L* — BNIP3-подобный белок (BCL2 interacting protein 3 like); *IGFs* — семейство инсулиноподобных факторов роста (Insulin-like growth factors); *CXCR4* — C-X-C-хемокиновый рецептор 4-го типа (C-X-C chemokine receptor type 4)

Согласно литературным данным, наличие полиморфизма A588T (rs11549467) в гене *HIF1A* у пациентов с КРР коррелирует с локализацией опухоли в прямой кишке, а также с ее большим размером [124]. Кроме того, наличие полиморфизмов с.1084C>T (p.L362L) и с.1121T>G (p.F374C) в гене *EPAS1* при КРР коррелирует с клинико-морфологическими параметрами. При наличии этих вариантов гена отмечаются больший размер опухоли, быстрые темпы прогрессии и более высокая частота осложнений в виде перфорации толстой кишки [125]. Ряд исследований демонстрирует взаимосвязь тяжести течения КРР с высокой экспрессией мРНК *HIF1A* и содержанием белка HIF-1 α в опухолевых тканях. При этом у таких пациентов также отмечается формирование резистентности опухоли к лечению [126], более частые рецидивы [127], неблагоприятный прогноз и низкая выживаемость [100, 128–130]. В то же время в некоторых работах [131–133] высокий уровень экспрессии мРНК *HIF1A* в опухолях не был связан с неблагоприятным прогнозом у пациентов с КРР.

Роль HIF-2 α в развитии КРР в литературе мало охарактеризована. На модели опухоли кишки у *Apc*^{min/+}-мышей, характеризующихся высокой частотой развития множественной кишечной неоплазии из-за нонсенс-мутации в 850 кодоне гена *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*) [134], было показано увеличение содержания белка-переносчика железа DMT-1 (Divalent Metal Transporter 1) в аденомах и карциномах по сравнению с животными контрольной группы [135]. Экспрессия гена, кодирующего белок DMT-1, регулируется HIF-2 α [136]. Увеличение содержания этого белка приводит к накоплению железа в клетках кишки и коррелирует с увеличением заболеваемости КРР у человека [137, 138]. Эти данные свидетельствуют о том, что нарушение регуляции транспорта железа в кишке, опосредованное HIF-2 α , имеет решающее значение для прогрессии опухолей толстой кишки. Однако при анализе биопсийных образцов пациентов с КРР получен противоречивый результат по прогностической значимости экспрессии *EPAS1* и содержания белка HIF-2 α . Показано, что их увеличение коррелирует с неблагоприятным прогнозом [131, 139]. Однако Рашид и соавт. отметили отсутствие взаимосвязи повышенного уровня экспрессии *EPAS1* и содержания белка HIF-2 α [128], а также Баба и соавт. выявлена обратная зависимость уровня экспрессии *EPAS1* от степени злокачественности опухоли и экспрессии *HIF1A* [140]. На мышах *Vhl*^{F/F}, *Vhl* ^{Δ IE}, *Vhl*^{F/F}/*Apc*^{min/+} и *Vhl* ^{Δ IE}/*Apc*^{min} с опухолями в толстой кишке, а также биопсийных образцах опухолей пациентов с КРР было показано, что содержание белка HIF-3 α в опухолевых тканях выше, чем в прилегающих к ним неопухолевых, и коррелирует с более низкой выживаемостью животных и неблагоприятным прогнозом у пациентов [141]. Кроме того, на клеточных линиях

HT29 и SW480 продемонстрировано, что HIF-3 α 1 усиливает пролиферацию опухолевых клеток путем активации сигнального пути JAK-STAT [141], а посредством регуляции белка ZEB2 (Zinc finger E-box Binding homeobox 2), который ингибирует синтез E-кадгерина, способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию [142].

Возможно, противоречивые данные о роли экспрессии разных изоформ *HIF* и содержании кодируемых ими белков в развитии КРР могут быть обусловлены гетерогенностью опухолей, а также вариабельностью размеров выборок для анализа в разных исследованиях. Кроме того, в исследованиях не учитывалась исходная устойчивость пациентов и лабораторных животных к недостатку кислорода, которая могла повлиять на полученные результаты.

Таким образом, роль транскрипционных факторов HIF в течении ХЯК и КРР различна и зависит от условий возникновения заболевания, но имеющихся в настоящее время исследований недостаточно для комплексного понимания этих процессов, так как данных о влиянии HIF-2 α и HIF-3 α на процессы воспаления и опухолевого роста в литературе крайне мало.

Роль устойчивости к гипоксии в развитии ЯК и САС

Разные уровни экспрессии генов и содержания белков семейства HIF, в частности HIF-1 α , регулируют индивидуальную реакцию организма на гипоксическое воздействие [18–20]. Индивидуальная устойчивость к недостатку кислорода зависит от пола, возраста, наличия сопутствующих заболеваний и биоритмов [18, 19, 99, 143–145]. Известно, что высокоустойчивые и низкоустойчивые к недостатку кислорода экспериментальные животные отличаются по уровню окислительного стресса, активности ферментов антиоксидантной защиты и другим параметрам, в том числе по содержанию HIF-1 α [143]. Ранее было показано, что у половозрелых самцов низкоустойчивых крыс в нормоксических условиях уровень HIF-1 α в неокортексе в 1,7 раза выше, чем у высокоустойчивых особей [18, 21]. При этом тяжесть течения системного воспалительного ответа у половозрелых и старых животных зависит от устойчивости к гипоксии и коррелирует с более высоким уровнем экспрессии *Hif1a* в печени у низкоустойчивых к недостатку кислорода крыс [21, 24].

Ранее нами были проведены исследования роли устойчивости к гипоксии в развитии острого и хронического колита, индуцированного ДСН, а также САС.

В экспериментах на самцах мышей C57Bl/6 с разной устойчивостью к гипоксии показано, что индуцированный ДСН (1,5% в течение 5 сут) острый колит у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных характеризуется более тяже-

лым течением по сравнению с высокоустойчивых [23, 26]. У низкоустойчивых к гипоксии мышей отмечалась большая распространенность язвенно-воспалительного процесса в медиальном и проксимальном отделах толстой кишки, а также более выраженные клинические проявления (кровь в кале, диарея). Также у низкоустойчивых животных выявлена акцидентальная инволюция тимуса с гиперплазией тимических телец, выраженное снижение содержания лимфоцитов, абсолютного числа клеток CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD4+CD25+FOXP3+, абсолютного и относительного числа CD19+-клеток в периферической крови, что свидетельствует о развитии транзиторного вторичного иммунодефицита.

Экспериментальный ДСН-индуцированный хронический колит у низкоустойчивых к недостатку кислорода животных характеризуется высокой гибелью животных, более выраженными клиническими проявлениями колита, большей распространенностью воспалительного инфильтрата в слизистой оболочке толстой кишки [22]. Также у низкоустойчивых к гипоксии мышей при хроническом колите, как и при остром, отмечается развитие вторичного иммунодефицита — наблюдаются снижение числа всех исследованных субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови, гиперплазия коркового вещества тимуса и высокая объемная доля светлых центров лимфоидных узелков селезенки [26]. В то же время у высокоустойчивых к недостатку кислорода животных отмечается только нарушение соотношения субпопуляций лимфоцитов в периферической крови — снижение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и Т-регуляторных клеток [22].

Показано, что инициация и прогрессия САС, индуцированного азоксиметаном и ДСН, у животных с разной устойчивостью к гипоксии варьирует [146]. Частота развития опухолей в дистальном отделе ободочной кишки у низкоустойчивых к гипоксии мышей была в 2 раза выше по сравнению с высокоустойчивыми. Кроме того, у низкоустойчивых к гипоксии животных все опухоли (100%) были представлены аденокарциномами, в то время как у высокоустойчивых — только 14%, а остальные — железистой интраэпителиальной неоплазией. Средняя площадь опухолей была статистически значимо выше у низкоустойчивых к гипоксии животных. Содержание F4/80+-макрофагов, лимфоцитов CD3-CD19+ и CD3+CD4+, а также NK-клеток в опухолях между животными с разной устойчивостью к гипоксии не различалось, однако число CD3+CD8+-лимфоцитов и клеток, экспрессирующих виментин, было выше у низкоустойчивых к гипоксии мышей. Вероятно, это свидетельствует, с одной стороны, о более выраженной активации противоопухолевого иммунитета у низкоустойчивых к гипоксии мышей в ответ на более быстрый процесс инициации

и прогрессии опухолей. С другой стороны, показано, что массивная инфильтрация Т-клеток CD8+ при почечно-клеточном раке является неблагоприятным прогностическим фактором [147].

Изменения экспрессии генов, регулирующих ответ на гипоксию (*Hif1a*, *Epas1*, *Hif3a*, *Vegf*) и воспаление (*Nfkb*, *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*), клеточный цикл и апоптоз (*Trp53*, *Pten*, *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Pcna*, *Mki67*, *Bax*, *Bcl2*), а также генов, кодирующих белки-компоненты эпителиального барьера (*Muc1*, *Muc13*, *Cldn2*, *Cldn7*) в опухолях и перитуморальной зоне, зависели от исходной устойчивости мышей к недостатку кислорода [146]. В опухолях у низкоустойчивых к гипоксии животных по сравнению с высокоустойчивыми, наблюдалась более высокая экспрессия *Hif3a*, *Vegf*, *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*, *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, *Muc1* и *Cldn7*, а в перитуморальной зоне — только *Egf*. Более высокая экспрессия *Hif3a* и *Vegf* в опухоли у низкоустойчивых к гипоксии особей по сравнению с высокоустойчивыми может свидетельствовать о более поздней стадии прогрессии опухоли у этих животных [64], *Tnfa* — об активной миграции иммунных клеток в зону опухолевого роста, а *Il10* и *Tgfb* — об активации механизма отрицательной обратной связи для снижения высокого уровня провоспалительных молекул [148, 149]. Рост опухоли сопровождается нарушением процессов дифференцировки, что связано с изменениями в процессах роста и развития клеток. Более высокая экспрессия *Egf*, *Egfr* и *Cmet* в опухолях низкоустойчивых к гипоксии мышей может быть обусловлена более активной пролиферацией опухолевых клеток и, соответственно, более поздней стадией развития опухоли [150, 151]. Также показано, что снижение соотношения *Bax/Bcl2* является негативным прогностическим маркером и может свидетельствовать о быстро прогрессирующем характере роста опухоли [152]. В нашем исследовании наблюдалось статистически значимое снижение соотношения *Bax/Bcl2* как в перитуморальной зоне, так и в фрагментах опухоли у низкоустойчивых к гипоксии мышей.

Выявлены различия реакции иммунной системы и воспалительного ответа у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии животных при САС [30]. У низкоустойчивых к недостатку кислорода мышей отмечаются более выраженные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (повышение числа СТЛ и В-лимфоцитов), повышение нейтрофильно-лимфоцитарного отношения, расширение светлых центров лимфоидных узелков селезенки, повышение абсолютного и относительного числа В-лимфоцитов и NK-клеток, абсолютного количества СТЛ, а также снижение относительного числа макрофагов в брыжеечных лимфатических узлах. Это отражает более выраженную антигенную стимуляцию, а также активацию иммунной системы в ответ на прогрессию опухоли. В то же время у высокоустойчи-

вых к гипоксии мышей при САС наблюдается гиперплазия коркового вещества тимуса, что отражает активное течение хронического колита.

Таким образом, исходная индивидуальная устойчивость организмов к гипоксии влияет на течение не только воспалительных заболеваний кишечника, но и на темпы опухолевого роста на фоне хронического воспаления. При проведении исследований, направленных на изучение роли HIF в развитии и прогрессии КРР, следует учитывать индивидуальную устойчивость организмов к гипоксии.

Заключение

Язвенный колит — хроническое воспалительное заболевание толстой кишки, которое в 1,6–3,7% случаев приводит к развитию ассоциированного с ним КРР. В механизмах развития САС ключевую роль играют хроническое воспаление и гипоксия. Активация белка NF- κ B, регулирующего клеточный ответ на воспаление, приводит к индукции экспрессии и синтезу HIF-1 α за счет наличия сайта связывания в соответствующем гене. Хронический воспалительный процесс сопровождается окислительным стрессом, что может приводить к возникновению мутаций в клетках, в том числе в эпителиальных, так как они

являются активно пролиферирующими в физиологических условиях. Все это приводит к инициации и прогрессии опухолей. Темпы развития САС во многом зависят от исходной устойчивости организма к гипоксии. У животных с низкой устойчивостью к гипоксии отмечаются более быстрые темпы инициации и прогрессии САС по сравнению с высокоустойчивыми особями, что характеризуется более высокой частотой развития аденокарцином, высокими уровнями экспрессии генов *Hif3a*, *Vegf*, *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*, *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, *Muc1* и *Cldn7* в опухолях, выраженных изменениях гематологических показателей и субпопуляций лимфоцитов в опухолях, брыжеечных лимфоузлах и крови. Понимание механизмов взаимосвязи устойчивости к гипоксии, HIF, особенностей течения хронических воспалительных и опухолевых процессов необходимо для разработки новых подходов к персонализированной терапии заболеваний, сопровождающихся недостатком кислорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-25-00294). Настоящая статья не содержит данных каких-либо исследований авторов с участием людей или животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turizo-Smith A.D., Córdoba-Hernandez S., Mejía-Guarnizo L.V., Monroy-Camacho P.S., Rodríguez-García J.A. Inflammation and cancer: friend or foe? *Front. Pharmacol.* 2024;15:1385479.
2. Korniluk A., Koper O., Kemon H., Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir. J. Med. Sci.* 2017;186(1):57–62.
3. Siegfried G., Descarpentrie J., Evrard S., Khatib A.-M. Proprotein convertases: Key players in inflammation-related malignancies and metastasis. *Cancer Lett.* 2020;473:50–61.
4. Miftahussurur M., Yamaoka Y., Graham D.Y. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. *Expert Rev. Mol. Med.* 2017;19:e4.
5. Kobayashi K., Tomita H., Shimizu M., Tanaka T., Suzui N., Miyazaki T., Hara A. p53 expression as a diagnostic biomarker in ulcerative colitis-associated cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(6):1284.
6. Shah S.C., Itzkowitz S.H. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management. *Gastroenterology.* 2022;162(3):715–730.e3.
7. Keller D.S., Windsor A., Cohen R., Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Tech. Coloproctol.* 2019;23(1):3–13.
8. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2014;345(2):235–241.
9. Brackmann S., Andersen S.N., Aamodt G., Langmark F., Clausen O.P.F., Aadland E., Fausa O., Rydning A., Vatn M.H. Relationship between clinical parameters and the colitis-colorectal cancer interval in a cohort of patients with colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2009;44(1):46–55.
10. Behzadi P., García-Perdomo H.A., Karpiński T.M. Toll-like receptors: General molecular and structural biology. *J. Immunol. Res.* 2021;2021:9914854.
11. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target Ther.* 2017;2:17023.
12. Rius J., Guma M., Schachtrup C., Akassoglou K., Zinkernagel A.S., Nizet V., Johnson R.S., Haddad G.G., Karin M. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature.* 2008;453(7196):807–811.
13. van Uden P., Kenneth N.S., Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J.* 2008;412(3):477–484.
14. van Uden P., Kenneth N.S., Webster R., Müller H.A., Mudie S., Rocha S. Evolutionary conserved regulation of HIF-1 β by NF- κ B. *PLoS Genet.* 2011;7(1):e1001285.
15. Dong S., Liang S., Cheng Z., Zhang X., Luo L., Li L., Zhang W., Li S., Xu Q., Zhong M., Zhu J., Zhang G., Hu S. ROS/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signalings activate HIF-1 α -induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022;41(1):15.
16. Feng Z., Zhang S., Han Q., Chu T., Wang H., Yu L., Zhang W., Liu J., Liang W., Xue J., Wu X., Zhang C., Wang Y. Liensinine sensitizes colorectal cancer cells to oxaliplatin by targeting HIF-1 α to inhibit autophagy. *Phyto-medicine.* 2024;129:155647.
17. Guo J., Meng F., Hu R., Chen L., Chang J., Zhao K., Ren H., Liu Z., Hu P., Wang G., Tai J. Inhibition of the NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway in colorectal can-

- cer by tyrosol: a gut microbiota-derived metabolite. *J. Immunother. Cancer*. 2024;12(9):e008831.
18. Kirova Y.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1 α levels in rat neocortex in different hypoxia regimens. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013;154(6):718–722.
 19. Dzhaliilova D., Kosyreva A., Vishnyakova P., Zolotova N., Tsvetkov I., Mkhitarov V., Mikhailova L., Kakturskiy L., Makarova O. Age-related differences in hypoxia-associated genes and cytokine profile in male Wistar rats. *Heliyon*. 2021;7(9):e08085.
 20. Kosyreva A.M., Dzhaliilova D.S., Makarova O.V., Tsvetkov I.S., Zolotova N.A., Diatroptova M.A., Ponomarenko E., Mkhitarov V., Khochanskiy D., Mikhailova L. Sex differences of inflammatory and immune response in pups of Wistar rats with SIRS. *Sci. Rep.* 2020;10(1):15884.
 21. Dzhaliilova D.S., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Ponomarenko E.A., Tsvetkov I.S., Zolotova N.A., Mkhitarov V., Khochanskiy D., Makarova O.V. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats. *J. Inflamm. Res.* 2019;12:73–86.
 22. Dzhaliilova D.S., Zolotova N.A., Polyakova M.A., Diatroptov M.E., Dobrynina M.T., Makarova O.V. Morphological features of the inflammatory process and subpopulation pattern of peripheral blood lymphocytes during chronic colitis in mice exhibiting different responses to hypoxia. *Clin. Exp. Morphology*. 2018;28(4):13–20.
 23. Dzhaliilova D.Sh., Polyakova M.A., Diatroptov M.E., Zolotova N.A., Makarova O.V. Morphological changes in the colon and composition of peripheral blood lymphocytes in acute colitis in mice with different resistance to hypoxia. *Mol. Med.* 2018;16(6):46–50.
 24. Dzhaliilova D.S., Silina M.V., Kosyreva A.M., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Morphological and molecular biological features of the systemic inflammatory response in old wistar rats with high and low resistance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2023;175(5):704–710.
 25. Dzhaliilova D.S., Silina M.V., Kosyreva A.M., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Comparative molecular and biological characteristic of the systemic inflammatory response in adult and old male Wistar rats with different resistance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2024;176(5):680–686.
 26. Dzhaliilova D.Sh., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Thymus morphological characteristics in acute and chronic colitis in animals with different hypoxia tolerance. *Russ. J. Immunol.* 2024;27(3):413–420.
 27. Dzhaliilova D.S., Zolotova N.A., Mkhitarov V.A., Kosyreva A.M., Tsvetkov I.S., Khalansky A.S., Alekseeva A.I., Fatkhudinov T.H., Makarova O.V. Morphological and molecular-biological features of glioblastoma progression in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats. *Sci. Rep.* 2023;13(1):12694.
 28. Fridman I.A., Ponomarenko E.A., Makarova O.V., Postovalova E.A., Zolotova N.A., Khochanskiy D.N., Mkhitarov V.A., Tsvetkov I.S., Kosyreva A.M. Morphological characteristic of melanoma B16 progression in C57BL/6 mice with high and low resistance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020;168(3):390–394.
 29. Dzhaliilova D.S., Silina M.V., Zolotova N.A., Portnova T.S., Vagabov M.D., Tsvetkov I.S., Makarova O.V. Morphological characteristics of colon tumors in mice with different tolerance to hypoxia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2024;177(1):162–168.
 30. Dzhaliilova D., Silina M., Kosyreva A., Fokichev N., Makarova O. Morphofunctional changes in the immune system in colitis-associated colorectal cancer in tolerant and susceptible to hypoxia mice. *PeerJ*. 2025;13:e19024.
 31. Lan T., Chen L., Wei X. Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*. 2021;10(1):100.
 32. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ. Health Prev. Med.* 2018;23(1):50.
 33. Fan Y., Mao R., Yang J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*. 2013;4(3):176–185.
 34. Odenwald M.A., Turner J.R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;14(1):9–21.
 35. Hardbower D.M., Coburn L.A., Asim M., Singh K., Sierra J.C., Barry D.P., Gobert A.P., Piazzuelo M.B., Washington M.K., Wilson K.T. EGFR-mediated macrophage activation promotes colitis-associated tumorigenesis. *Oncogene*. 2017;36(27):3807–3819.
 36. Wang Z., Chang Y., Sun H., Li Y., Tang T. Advances in molecular mechanisms of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer (Review). *Oncol. Lett.* 2024;27(6):257.
 37. Whiteside T.L. The role of regulatory T cells in cancer immunology. *Immunotargets Ther.* 2015;4:159–171.
 38. Whiteside T.L. NK cells in the tumor microenvironment and thioredoxin activity. *J. Clin. Invest.* 2020;130(10):5115–5117.
 39. Whiteside T.L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008;27(45):5904–5912.
 40. Khan S.U., Khan M.U., Azhar Ud.Din.M., Khan I.M., Khan M.I., Bungau S., Hassan S.S.U. Reprogramming tumor-associated macrophages as a unique approach to target tumor immunotherapy. *Front. Immunol.* 2023;14:1166487.
 41. Yang H., Zhang Q., Xu M., Wang L., Chen X., Feng Y., Li Y., Zhang X., Cui W., Jia X. CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis. *Mol. Cancer*. 2020;19(1):41.
 42. Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* 2019;26(1):78.
 43. Onizawa M., Nagaishi T., Kanai T., et al. Signaling pathway via TNF- α /NF- κ B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009;296(4):G850–G859.
 44. Wang X., Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* 2008;29(11):1275–1288.
 45. Bassiouni W., Ali M.A.M., Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J.* 2021;288(24):7162–7182.
 46. Nabors L.B., Suswam E., Huang Y., Yang X., Johnson M.J., King P.H. Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res.* 2003;63(14):4181–4187.
 47. Tomita Y., Yang X., Ishida Y., Nemoto-Sasaki Y., Kondo T., Oda M., Watanabe G., Chaldakov G.N., Fujii C., Mukaida N. Spontaneous regression of lung metastasis in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Int. J. Cancer*. 2004;112(6):927–933.

48. Zou H., Li R., Hu H., Hu Y., Chen X. Modulation of regulatory T cell activity by TNF receptor type II-targeting pharmacological agents. *Front. Immunol.* 2018;9:594.
49. Singh N., Baby D., Rajguru J.P., Patil P.B., Thakannavar S.S., Pujari V.B. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.* 2019;18(3):121–126.
50. Ahmad N., Ammar A., Storr S.J., Green A.R., Rakha E., Ellis I.O., Martin S.G. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(4):537–549.
51. Saxena N.K., Vertino P.M., Anania F.A., Sharma D. leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J. Biol. Chem.* 2007;282(18):13316–13325.
52. Braun D.A., Fribourg M., Sealfon S.C. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J. Biol. Chem.* 2013;288(5):2986–2993.
53. Qu Z., Sun F., Zhou J., Li L., Shapiro S.D., Xiao G. Interleukin-6 prevents the initiation but enhances the progression of lung cancer. *Cancer Res.* 2015;75(16):3209–3215.
54. Yin Y., Wan J., Yu J., Wu K. Molecular pathogenesis of colitis-associated colorectal cancer: immunity, genetics, and intestinal microecology. *Inflamm. Bowel Dis.* 2023;29(10):1648–1657.
55. Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759–767.
56. Scarpa M., Scarpa M., Castagliuolo I., Erroi F., Kotsafti A., Basato S., Brun P., D'Inca R., Rugge M., Angriman I., Castoro C. Aberrant gene methylation in non-neoplastic mucosa as a predictive marker of ulcerative colitis-associated CRC. *Oncotarget.* 2016;7(9):10322–10331.
57. Emmett R.A., Davidson K.L., Gould N.J., Arasradnam R.P. DNA methylation patterns in ulcerative colitis-associated cancer: a systematic review. *Epigenomics.* 2017;9(7):1029–1042.
58. Bocchetti M., Ferraro M.G., Ricciardiello F., Ottaitano A., Luce A., Cossu A.M., Scrima M., Leung W.Y., Abate M., Stiuso P., Caraglia M., Zappavigna S., Yau T.O. The role of microRNAs in development of colitis-associated colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(8):3967.
59. Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2 -regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292(5516):468–472.
60. Haase V.H. HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism. *Hemodial. Int.* 2017;21 Suppl. 1(Suppl. 1):S110–S124.
61. Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399(6733):271–275.
62. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiano J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin Jr W.G.. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O_2 sensing. *Science.* 2001;292(5516):464–468.
63. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2016;310(4):C260–C269.
64. Jaskiewicz M., Moszynska A., Serocki M., Króliczewski J., Bartoszewski S., Collawn J.F., Bartoszewski R. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α 2 serves as an endothelial cell fate executor during chronic hypoxia. *EXCLI J.* 2022;21:454–469.
65. Silina M.V., Dzhalilova D.S., Makarova O.V. Role of MicroRNAs in regulation of cellular response to hypoxia. *Biochemistry (Mosc.).* 2023;88(6):741–757.
66. Lee P., Chandel N.S., Simon M.C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020;21(5):268–283.
67. Sebestyén A., Kopper L., Dankó T., Timár J. Hypoxia signaling in cancer: from basics to clinical practice. *Pathol Oncol Res.* 2021;27:1609802.
68. Korbecki J., Simińska D., Gąssowska-Dobrowolska M., Listos J., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. Chronic and cycling hypoxia: Drivers of cancer chronic inflammation through HIF-1 and NF- κ B activation: A review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10701.
69. Hellwig-Bürgel T., Rutkowski K., Metzen E., Fandrey J., Jelkmann W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 1999;94(5):1561–1567.
70. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature.* 2013;496(7444):238–242.
71. Sharma V., Dixit D., Koul N., Mehta V.S., Sen E. Ras regulates interleukin-1 β -induced HIF-1 α transcriptional activity in glioblastoma. *J. Mol. Med.* 2011;89(2):123–136.
72. Malkov M.I., Lee C.T., Taylor C.T. Regulation of the hypoxia-inducible factor (HIF) by pro-inflammatory cytokines. *Cells.* 2021;10(9):2340.
73. Koivunen P., Hirsilä M., Günzler V., Kivirikko K.I., Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J. Biol. Chem.* 2004;279(11):9899–9904.
74. Jantsch J., Wiese M., Schödel J., Castiglione K., Gläser J., Kolbe S., Mole D., Schleicher U., Eckardt K.U., Hensel M., Lang R., Bogdan C., Schnare M., Willam C. Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 2011;90(3):551–562.
75. Peyssonnaud C., Cejudo-Martin P., Doedens A., Zinkernagel A.S., Johnson R.S., Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J. Immunol.* 2007;178(12):7516–7519.
76. Silina M.V., Dzhalilova D.S., Diatropova M.A., Grin O.O., Babaev M.A., Makarova O.V. Differences in the blood levels of HIF-1 α and VNN1 and expression of HIF1A and NFKB1 in leukocytes in cardiological patients with risk of postoperative complications. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2025;178(6):691–696.
77. Karhausen J., Furuta G.T., Tomaszewski J.E., Johnson R.S., Colgan S.P., Haase V.H. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J. Clin. Invest.* 2004;114(8):1098–1106.
78. Cummins E.P., Seeballuck F., Keely S.J., Mangam N.E., Callanan J.J., Fallon P.G., Taylor C.T. The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology.* 2008;134(1):156–165.

79. Manresa M.C., Taylor C.T. Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2017;3(3):303–315.
80. Brown E., Taylor C.T. Hypoxia-sensitive pathways in intestinal inflammation. *J. Physiol. (Lond.)*. 2018;596(15):2985–2989.
81. Dvornikova K.A., Platonova O.N., Bystrova E.Y. Hypoxia and intestinal inflammation: common molecular mechanisms and signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(3):2425.
82. Barbi J., Pardoll D., Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol. Rev.* 2013;252(1):52–77.
83. Pazmandi J., Kalinichenko A., Ardy R.C., Boztug K. Early-onset inflammatory bowel disease as a model disease to identify key regulators of immune homeostasis mechanisms. *Immunol. Rev.* 2019;287(1):162–185.
84. Sukumar M., Liu J., Ji Y., et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8⁺ T cell memory and antitumor function. *J. Clin. Invest.* 2013;123(10):4479–4488.
85. Sun M., He C., Wu W., Zhou G., Liu F., Cong Y., Liu Z. Hypoxia inducible factor-1 α -induced interleukin-33 expression in intestinal epithelia contributes to mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2017;187(3):428–440.
86. Monticelli L.A., Osborne L.C., Noti M., Tran S.V., Zaiss D.M.W., Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(34):10762–10767.
87. Bäcker V., Cheung F.-Y., Siveke J.T., Fandrey J., Winning S. Knockdown of myeloid cell hypoxia-inducible factor-1 α ameliorates the acute pathology in DSS-induced colitis. *PLoS One*. 2017;12(12):e0190074.
88. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B.E., Förster I., Pawlinski R., Mackman N., Haase V.H., Jaenisch R., Corr M., Nizet V., Firestein G.S., Gerber H.P., Ferrara N., Johnson R.S. HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*. 2003;112(5):645–657.
89. Scheerer N., Dehne N., Stockmann C., Swoboda S., Baba H.A., Neugebauer A., Johnson R.S., Fandrey J. Myeloid hypoxia-inducible factor-1 α is essential for skeletal muscle regeneration in mice. *J. Immunol.* 2013;191(1):407–414.
90. Flück K., Breves G., Fandrey J., Winning S. Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis. *Mucosal. Immunol.* 2016;9(2):379–390.
91. Triner D., Xue X., Schwartz A.J., Jung I., Colacino J.A., Shah Y.M. Epithelial hypoxia-inducible factor 2 α facilitates the progression of colon tumors through recruiting neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* 2017;37(5):e00481–16.
92. Kerber E.L., Padberg C., Koll N., Schuetzhold V., Fandrey J., Winning S. The importance of hypoxia-inducible factors (HIF-1 and HIF-2) for the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(22):8551.
93. Dzhililova D.S., Makarova O.V. HIF-dependent mechanisms of relationship between hypoxia tolerance and tumor development. *Biochemistry (Mosc.)*. 2021;86(10):1163–1180.
94. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 2013;14(1):65–77.
95. Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Talanov E.Y., Starinets V.S., Tenkov K.S., Zakharova N.M., Belosludtseva N.V. Transport of Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent permeability transition in the liver and heart mitochondria of rats with different tolerance to acute hypoxia. *Biomolecules*. 2020;10(1):114.
96. Glazachev O.S., Gepe N.A., Timofeev Yu.S., Samartseva V.G., Dudnik E.N., Zapara M.A., Chebysheva S.N. Indicators of individual hypoxia resistance – a way to optimize hypoxic training for children. *Russ. Vestn. Perinatol. Pediatr.* 2020;65(4):78–84.
97. Lu H., Wang R., Li W., Xie H., Wang C., Hao Y., Sun Y., Jia Z. Plasma cytokine profiling to predict susceptibility to acute mountain sickness. *Eur. Cytokine Netw.* 2016;27(4):90–96.
98. Soree P., Gupta R.K., Singh K., Desiraju K., Agrawal A., Vats P., Bharadwaj A., Baburaj T.P., Chaudhary P., Singh V.K., Verma S., Bajaj A.C., Singh S.B. Raised HIF1 α during normoxia in high altitude pulmonary edema susceptible non-mountaineers. *Sci. Rep.* 2016;6:26468.
99. Urakov A., Urakova N., Gurevich K., Muhutdinov N. Cardiology, respiratory failure, and tolerance of hypoxia in the context of COVID-19: a multidisciplinary perspective. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2022;23(1):21.
100. Ioannou M., Paraskeva E., Baxevanidou K., Simos G., Papamichali R., Papacharalambous C., Samara M., Koukoulis G. HIF-1 α in colorectal carcinoma: review of the literature. *J. BUON*. 2015;20(3):680–689.
101. Däster S., Amatruda N., Calabrese D., Ivanek R., Turrini E., Droeser R.A., Zajac P., Fimognari C., Spagnoli G.C., Iezzi G., Mele V., Muraro M.G. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget*. 2017;8(1):1725–1736.
102. Riffle S., Hegde R.S. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2017;36(1):102.
103. Sorokin M., Buzdin A.A., Guryanova A., et al. Large-scale assessment of pros and cons of autopsy-derived or tumor-matched tissues as the norms for gene expression analysis in cancers. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2023;21:3964–3986.
104. Semenza G.L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* 2002;8(4 Suppl.):S62–S67.
105. Heldin C.-H., Rubin K., Pietras K., Ostman A. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4(10):806–813.
106. Siemann D.W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by tumor-vascular disrupting agents. *Cancer Treat. Rev.* 2011;37(1):63–74.
107. Yu T., Tang B., Sun X. Development of Inhibitors targeting hypoxia-inducible factor 1 and 2 for cancer therapy. *Yonsei Med. J.* 2017;58(3):489–496.
108. Semenza G.L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. 2010;29(5):625–634.
109. Jun J.C., Rathore A., Younas H., Gilkes D., Polotsky V.Y. Hypoxia-inducible factors and cancer. *Curr. Sleep Med. Rep.* 2017;3(1):1–10.
110. Markov D., Poryazova E., Raycheva R., Markov G. Expression of HIF-1 α , Ki67, SMA and E-cadherin in endometriosis, endometrial and ovarian carcinoma. *Folia Med. (Plovdiv)*. 2024;66(1):97–103.

111. Yang Y., Wu J., Zhu H., Shi X., Liu J., Li Y., Wang M. Effect of hypoxia-HIF-1 α -periostin axis in thyroid cancer. *Oncol. Rep.* 2024;51(4):57.
112. Hao B., Dong H., Xiong R., Song C., Xu C., Li N., Geng Q. Identification of SLC2A1 as a predictive biomarker for survival and response to immunotherapy in lung squamous cell carcinoma. *Comput. Biol. Med.* 2024;171:108183.
113. S V., Balasubramanian S., Perumal E., Santhakumar K. Identification of key genes and signalling pathways in clear cell renal cell carcinoma: An integrated bioinformatics approach. *Cancer Biomark.* 2024;40(1):111–123.
114. Mahapatra N., Panda A., Dash K., Bhuyan L., Mishra P., Mohanty A. The study of expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) and hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *Cureus.* 2023;15(9):e45189.
115. Flamme I., Krieg M., Plate K.H. Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2alpha. *Am. J. Pathol.* 1998;153(1):25–29.
116. Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Sivridis E., Turley H., Talks K., Pezzella F., Gatter K.C., Harris A.L. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br. J. Cancer.* 2001;85(6):881–890.
117. Garcia Garcia C.J., Huang Y., Fuentes N.R., et al. Stromal HIF2 regulates immune suppression in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology.* 2022;162(7):2018–2031.
118. Contenti J., Guo Y., Larcher M., et al. HIF-1 inactivation empowers HIF-2 to drive hypoxia adaptation in aggressive forms of medulloblastoma. *BioRxiv.* 2023;10(1):338.
119. Liu J., Jiang Y., Chen L., Qian Z., Zhang Y. Associations between HIFs and tumor immune checkpoints: mechanism and therapy. *Discov. Oncol.* 2024;15(1):2.
120. Zhang R., Zhao J., Zhao L. EPAS1/HIF-2 α acts as an unanticipated tumor-suppressive role in papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Gen. Med.* 2023;16:2165–2174.
121. Burtcher M., Mairer K., Wille M., Gatterer H., Ruedl G., Faulhaber M., Summan G. Short-term exposure to hypoxia for work and leisure activities in health and disease: which level of hypoxia is safe? *Sleep Breath.* 2012;16(2):435–442.
122. Maynard M.A., Evans A.J., Shi W., Kim W.Y., Liu F.-F., Ohh M. Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle.* 2007;6(22):2810–2816.
123. Silakit R., Kitirat Y., Thongchot S., Loilome W., Techasen A., Ungarreevittaya P., Khuntikeo N., Yongvanit P., Yang J.H., Kim N.H., Yook J.I., Namwat N. Potential role of HIF-1-responsive microRNA210/HIF3 axis on gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma cells. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199827.
124. Knechtel G., Szkandera J., Stotz M., Hofmann G., Langsenlehner U., Krippel P. Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 gene and colorectal cancer risk. *Mol. Carcinog.* 2010;49(9):805–809.
125. Islam F., Gopalan V., Lu C.T., Pillai S., Lam A.K. Identification of novel mutations and functional impacts of EPAS1 in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2021;10(16):5557–5573.
126. Rohwer N., Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat.* 2011;14(3):191–201.
127. Wei T.-T., Lin Y.-T., Tang S.-P., Luo C.-K., Tsai C.-T., Shun C.-T., Chen C.-C. Metabolic targeting of HIF-1 α potentiates the therapeutic efficacy of oxaliplatin in colorectal cancer. *Oncogene.* 2020;39(2):414–427.
128. Rasheed S., Harris A.L., Tekkis P.P., Turley H., Silver A., McDonald P.J., Talbot I.C., Glynne-Jones R., Northover J.M., Guenther T. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis. *Br. J. Cancer.* 2009;100(10):1666–1673.
129. Schmitz K.J., Müller C.I., Reis H., Alakus H., Winde G., Baba H.A., Wohlschlaeger J., Jasani B., Fandrey J., Schmid K.W. Combined analysis of hypoxia-inducible factor 1 alpha and metallothionein indicates an aggressive subtype of colorectal carcinoma. *Int. J. Colorectal. Dis.* 2009;24(11):1287–1296.
130. Rajaganeshan R., Prasad R., Guillou P.J., Scott N., Poston G., Jayne D.G. Expression patterns of hypoxic markers at the invasive margin of colorectal cancers and liver metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2009;35(12):1286–1294.
131. Yoshimura H., Dhar D.K., Kohno H., Kubota H., Fujii T., Ueda S., Kinugasa S., Tachibana M., Nagasue N. Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(24):8554–8560.
132. Kuwai T., Kitadai Y., Tanaka S., Onogawa S., Matsutani N., Kaio E., Ito M., Chayama K. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2003;105(2):176–181.
133. Furlan D., Sahnane N., Carnevali I., Cerutti R., Bertoni F., Kwee I., Uccella S., Bertolini V., Chiaravalli A.M., Capella C. Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum. Pathol.* 2008;39(10):1483–1494.
134. Ren J., Sui H., Fang F., Li Q., Li B. The application of ApcMin/+ mouse model in colorectal tumor researches. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2019;145(5):1111–1122.
135. Xue X., Taylor M., Anderson E., Hao C., Qu A., Greenson J.K., Zimmermann E.M., Gonzalez F.J., Shah Y.M. Hypoxia-inducible factor-2 α activation promotes colorectal cancer progression by dysregulating iron homeostasis. *Cancer Res.* 2012;72(9):2285–2293.
136. Shah Y.M., Matsubara T., Ito S., Yim S.-H., Gonzalez F.J. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.* 2009;9(2):152–164.
137. Nelson R.L. Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutr. Rev.* 2001;59(5):140–148.
138. Seril D.N., Liao J., Ho K.-L.K., Warsi A., Yang C.S., Yang G.-Y. Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. *Dig. Dis. Sci.* 2002;47(6):1266–1278.
139. Chen Z., He X., Xia W., Huang Q., Zhang Z., Ye J., Ni C., Wu P., Wu D., Xu J., Qiu F., Huang J. Prognostic value and clinicopathological differences of HIFs in colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(12):e80337.
140. Baba Y., Noshio K., Shima K., Irahara N., Chan A.T., Meyerhardt J.A., Chung D.C., Giovannucci E.L.,

Fuchs C.S., Ogino S. HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* 2010;176(5):2292–2301.

141. Xue X., Jungles K., Onder G., Samhoun J., Györfy B., Hardiman K.M. HIF-3 α promotes colorectal tumor cell growth by activation of JAK-STAT3 signaling. *Oncotarget.* 2016;7(10):11567–11579.

142. Villareal L.B., Falcon D.M., Xie L., Xue X. Hypoxia-inducible factor 3 α 1 increases epithelial-to-mesenchymal transition and iron uptake to drive colorectal cancer liver metastasis. *Br. J. Cancer.* 2024;130(12):1904–1915.

143. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Differential activation of myocardial ER stress response: a possible role in hypoxic tolerance. *Int. J. Cardiol.* 2013;168(5):4667–4677.

144. Jain K., Suryakumar G., Ganju L., Singh S.B. Differential hypoxic tolerance is mediated by activation of heat shock response and nitric oxide pathway. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19(6):801–812.

145. Dzhalilova D., Makarova O. Differences in tolerance to hypoxia: Physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics. *Biomedicines.* 2020;8(10):428.

146. Dzhalilova D., Silina M., Tsvetkov I., Kosyreva A., Zolotova N., Gantsova E., Kirillov V., Fokichev N., Makarova O. Changes in the expression of genes regulating the response to hypoxia, inflammation, cell cycle, apoptosis, and epithelial barrier functioning during colitis-associated colorectal cancer depend on individual hypoxia tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(14):7801.

147. Dai S., Zeng H., Liu Z., et al. Intratumoral CXCL13+CD8+T cell infiltration determines poor clinical outcomes and immunoevasive contexture in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J. Immunother. Cancer.* 2021;9(2):e001823.

148. Yun S.-M., Kim S.-H., Kim E.-H. The molecular mechanism of transforming growth factor- β signaling for intestinal fibrosis: A mini-review. *Front. Pharmacol.* 2019;10:162.

149. Saraiva M., O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10(3):170–181.

150. Navab R., Liu J., Seiden-Long I., et al. Co-overexpression of Met and hepatocyte growth factor promotes systemic metastasis in NCI-H460 non-small cell lung carcinoma cells. *Neoplasia.* 2009;11(12):1292–1300.

151. Ghosh P., Beas A.O., Bornheimer S.J., Garcia-Marcos M., Forry E.P., Johansson C., Ear J., Jung B.H., Cabrera B., Carethers J.M., Farquhar M.G. A G α i-GIV molecular complex binds epidermal growth factor receptor and determines whether cells migrate or proliferate. *Mol. Biol. Cell.* 2010;21(13):2338–2354.

152. Khodapasand E., Jafarzadeh N., Farrokhi F., Kamalidehghan B., Houshmand M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iran Biomed. J.* 2015;19(2):69–75.

Поступила в редакцию 17.02.2025

После доработки 15.05.2025

Принята в печать 06.06.2025

REVIEW

The role of hypoxia and HIF transcription factors in the development of ulcerative colitis and associated colorectal cancer

M.V. Silina* , D.Sh. Dzhalilova , O.V. Makarova 

“Petrovsky National Research Centre of Surgery,” Tsyurupy str., 3, Moscow, 117418, Russia

*e-mail: marusyasilina99@yandex.ru

One of the factors contributing to the development of colorectal cancer is inflammation. Chronic ulcerative colitis may be the cause of the Colitis-Associated Colorectal cancer (CAC) development in 1.6–3.7% of cases. The main regulator of the cellular response to inflammation is the NF- κ B protein, which induces the expression and synthesis of the transcription factor HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1 α) due to the presence of a binding site in the corresponding gene. Oxidative stress that occurs during the inflammatory process often leads to mutations in cells. The DNA of rapidly proliferating colonic epithelial cells becomes a target for reactive oxygen species, eventually leading to tumor initiation and progression. The rate of CAC development depends largely on the initial hypoxia resistance of organisms. Susceptible to hypoxia animals have faster rates of CAC initiation and progression compared to tolerant, which is characterized by a higher frequency of adenocarcinoma development, high expression levels of *Hif3a*, *Vegf*, *Tnfa*, *Il10*, *Tgfb*, *Cmet*, *Egf*, *Egfr*, *Bax*, *Muc1* and *Cldn7* genes in tumors, pronounced changes in hematological parameters and imbalance of lymphocyte subpopulations in tumors, mesenteric lymph nodes and blood. Understanding the interrelation mechanisms of hypoxia resistance, HIF activity, peculiarities of the chronic inflammatory and tumor processes course is necessary for the development of new approaches to personalized therapy of diseases accompanied by oxygen deficiency.

Keywords: *colorectal cancer, ulcerative colitis, hypoxia resistance, HIF, inflammation, inflammatory bowel disease*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-25-00294.

Сведения об авторах

Силина Мария Валерьевна — мл. науч. сотр. лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: marusyasilina99@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7781-5537>

Джалилова Джулия Шавкатовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: juliajal93@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Макарова Ольга Васильевна — докт. мед. наук, зав. лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»; проф. кафедры клеточной биологии и гистологии, биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: makarov.olga2013@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 599.323.41:591.139+591.82

Возрастные изменения тканевой антиоксидантной защиты у лесной мышовки (*Sicista betulina*, Rodentia) на северной периферии ареала обитания

Е.П. Антонова^{1, 2, *} , В.А. Илюха^{2, 3} , А.Е. Якимова¹ ,
И.В. Баишникова¹ , Т.Н. Ильина¹ 

¹ Институт биологии, Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», Россия, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11;

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

³ Институт биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина, Российская академия наук, Россия, 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок
*e-mail: antonova88ep@mail.ru

Проведено исследование уровня тканевых антиоксидантов у молодых и взрослых (зимовавших) особей зимоспящего вида — лесной мышовки (*Sicista betulina* Pallas, 1779), обитающей вблизи северной границы ареала распространения (Республика Карелия). Показана гетерохронность возрастных изменений показателей антиоксидантной системы: активность каталазы в почках снижалась, а в сердце, напротив, увеличивалась с возрастом; у взрослых особей лесной мышовки активность супероксиддисмутазы в почках, сердечной и скелетной мышце выше, чем у молодых животных. У молодых особей отмечен более низкий уровень низкомолекулярных антиоксидантов — восстановленного глутатиона (почки и сердце) и α -токоферола (сердце и скелетная мышца) — по сравнению с зимовавшими животными, что, вероятно, связано не только с активным ростом и высокой степенью подвижности молодых особей в период расселения, но и с напряженностью физиологических систем в связи с обитанием в условиях Севера и подготовкой к зимней спячке. Обнаружены более высокие уровни восстановленного глутатиона и α -токоферола в сердце зимовавших особей лесной мышовки по сравнению с другими зимовавшими представителями отряда Rodentia, обитающими в Республике Карелия, что подчеркивает важную роль низкомолекулярных антиоксидантов в защите тканей от окислительных повреждений у этого вида.

Ключевые слова: млекопитающие, антиоксиданты, зимоспящие, старение, гомеостаз, витамин E

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-2

Введение

Окислительный стресс представляет собой универсальное звено развития как возрастных изменений, так и патологического процесса многих заболеваний [1, 2]. Обусловлено это тем, что с возрастом в результате ухудшения функционального состояния митохондрий усиливается образование активных форм кислорода (АФК), которые легко вступают во взаимодействие с липидами и нуклеиновыми кислотами, карбоксильными, амидными и заряженными аминокислотными группами аминокислотных остатков белков, вызывая их окислительную модификацию. Наряду с этим, снижается устойчивость антиоксидантной системы (АОС), что также способствует свободнорадикальному поврежде-

нию клеток и развитию возрастных патологий [1]. Возрастные изменения антиоксидантной защиты тканей у млекопитающих, как правило, асинхронны и могут значительно варьировать между видами [3, 4]. Особый интерес в этом плане представляют мелкие зимоспящие виды, адаптированные к условиям гипоксии и реоксигенации и способные значительно изменять уровень метаболизма и окислительно-восстановительные процессы в тканях [5, 6].

Лесная мышовка (*Sicista betulina* Pallas, 1779) — представитель семейства мышовковые (Sminthidae), обитающий преимущественно в таежной зоне, относится к мелким зимоспящим видам и обладает уникальными характеристиками гиберна-

ции [7]. Во-первых, период зимней спячки у лесной мышовки может длиться более семи месяцев [8]. Во-вторых, скорости охлаждения (cooling rate, CR) и разогревания (warming rate, WR) при пробуждении от гибернации у лесной мышовки очень высоки (CR – 1,53°C ч⁻¹, а WR – 72,0°C ч⁻¹). Для сравнения, у схожих по массе тела гибернирующих видов – северной карликовой мыши (*Baiomys taylori* Thomas, 1887) и ночницы Наттерера (*Myotis nattereri* Kuhl, 1817) – эти показатели равны: CR – 1,44 и 0,77, а WR – 20,4 и 63,0, °C ч⁻¹ соответственно [7]. Температура тела лесной мышовки может повышаться на величину до 1°C в минуту, а потребление кислорода в течение 30 мин увеличиться в 25 раз, что значительно выше, чем у других гибернирующих видов млекопитающих [7, 9]. Известно, что резкое повышение температуры и скорости метаболизма в период пробуждения сопровождается окислительным стрессом, ассоциированным с увеличением потребления кислорода [10]. Особое значение в этих условиях приобретает система антиоксидантной защиты, которая минимизирует окислительные повреждения тканей. Несмотря на колоссальные метаболические изменения, средняя продолжительность жизни зимоспящей лесной мышовки в условиях Севера составляет 2,5–3 г. [8], при том, что у близкого по размеру негибернирующего вида грызунов – рыжей полевки (*Myodes glareolus* Schreber, 1780) – она равняется 13–15 мес. [11]. В связи с этим, интересным является вопрос о влиянии гибернации на механизмы биологического старения, в которых, безусловно, важное значение имеют повреждения биомолекул внутренними и внешними факторами при окислительном метаболизме [5]. В доступной нам литературе встречаются исследования, выполненные на разных гибернирующих видах сусликов, хомяков, а также рукокрылых [5, 6, 10, 12–15], в то время как сведения о возрастных изменениях АОС у мелких зимоспящих представителей отряда Rodentia отсутствуют.

Целью нашего исследования стало изучение уровня антиоксидантов в тканях (сердце, печень, почки и скелетные мышцы) у молодых (сеголетки) и взрослых (зимовавшие) особей лесной мышовки, обитающих вблизи северной границы ареала распространения (Республика Карелия).

Таблица 1

Характеристика лесных мышовок, отловленных для исследования

Возраст	Количество, самцы / самки	Масса тела, г	Длина тела, мм
Молодые (сеголетки)	8/5	7,12 (6,23; 7,72)	59,20 (57,10; 63,30)
Взрослые (зимовавшие)	7/5	8,94* (6,62; 9,60)	64,85 (55,80; 68,75)

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с молодыми животными (p < 0,05).

Материалы и методы

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» с соблюдением международных принципов Директивы Евросоюза 2010/63/EU о гуманном отношении к животным и правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. Объектами исследования антиоксидантного статуса тканей являлись добытые в июле-августе в подзоне средней тайги на Северо-Западе России особи лесной мышовки (*Sicista betulina*): молодые (сеголетки, 8♂ и 5♀) и взрослые (зимовавшие, 7♂ и 5♀) (табл. 1).

Животных отлавливали стандартными методами в основных типах биотопов, используя ловушки (давилки) фабричного производства и ловчие канавки. После отлова животных взвешивали, измеряли длину тела, определяли возраст, пол и отбирали образцы тканей, которые замораживали до проведения анализа. При отнесении животного к той или иной возрастной группе учитывались следующие признаки: развитие тимуса, строение черепа, состояние репродуктивной системы. Необходимо отметить, что в условиях Северо-Запада России лесные мышовки впервые начинают размножаться в возрасте около года, после первой зимовки и в год рождения никаких изменений в их гонадах, характерных для полового созревания, не обнаруживается [8]. Размеры тела и тимуса прибылых особей достоверно отличаются от размеров зимовавших, что также позволяет разделить выборку на зимовавших и прибылых зверьков.

Спектрофотометрически (приборы Thermo Spectronic Genesys 20 spectrophotometer (Thermo-Fisher Waltham, США), спектрофотометр СФ-2000 (Россия), мультимодальный ридер SuPerMax 3000FA (Китай)) исследовали активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также содержание восстановленного глутатиона (GSH). Анализ проб проводили в трех повторностях. Для определения активности антиоксидантных ферментов и содержания белка гомогенаты тканей готовили в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН 7,0). После центрифугирования при 6000g в течение 15 мин в полученных супернатантах измеряли активность ферментов: СОД – по модифицированной адrenoхромной методике [16], а каталазы – по количеству разложенного H₂O₂ [17]. За 1 усл. ед. активности СОД принимали количество фермента, способное затормозить реакцию автоокисления адrenalина на 50%, а за 1 ед. активности каталазы – количество мкмоль H₂O₂, разложенного за 1 мин. Содержание белка определяли по методу Лоури [18] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Удельную активность антиоксидантных ферментов рассчитыва-

ли на 1 мг белка. Содержание GSH определяли по методу Элмана и выражали в мкмоль/г ткани [19].

Содержание α -токоферола (витамин Е) определяли в печени, почках, сердце и скелетной мышце методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Милихром-6, Россия) [20]. Образцы тканей (100 мг) гомогенизировали в 0,9 мл 0,25 М раствора сахарозы (рН 7,4) в качестве суспензирующей среды. К гомогенату добавляли 0,025%-ный раствор бутилгидрокситолуола в этиловом спирте и тщательно смешивали для осаждения белков (конечная концентрация бутилгидрокситолуола составила 0,0125%). Приливали 0,0125%-ный раствор бутилгидрокситолуола в н-гексане (конечная концентрация бутилгидрокситолуола – 0,0125%), смесь встряхивали в течение 5 мин, затем центрифугировали при 3000g в течение 10 мин и выдерживали в течение 40 мин при 4°C. Пробу для хроматографического анализа отбирали из верхнего гексанового слоя, элюентом служила смесь гексана с изопропанолом в соотношении 98,5:1,5. Детектирование проводили при 292 нм. При построении калибровочных кривых использовали стандартные растворы α -токоферола (Sigma-Aldrich, США).

Полученные данные обработаны статистическими методами и были представлены в виде медианы (Me) и процентилей (25%, 75%) (распределение, отличное от нормального). Сравнение

проводили с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни (выявление различий между медианами двух выборок с распределением данных, отличным от нормального). Не обнаружено значимых различий между самками и самцами по исследуемым показателям, поэтому данные были объединены для последующего анализа. Для выявления взаимосвязей между изучаемыми показателями, а также оценки их силы и направления использовали корреляционный анализ. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В результате проведенного исследования выявлены тканеспецифические особенности антиоксидантной защиты тканей у лесной мышовки. В печени животных не обнаружено статистически значимых различий активности СОД и каталазы (рис. 1), а также содержания GSH и α -токоферола (табл. 2) между молодыми и взрослыми животными.

В почках у лесной мышовки наблюдалось увеличение активности СОД и содержания GSH с возрастом, однако активность каталазы, напротив, была ниже у взрослых зимовавших животных по сравнению с молодыми (рис. 1). В сердце у сеголеток обнаружен более низкий уровень антиоксидантов (рис. 2 – активности каталазы и СОД, табл. 2 – содержание GSH и α -токоферола) по сравнению с показателями зимовавших особей.

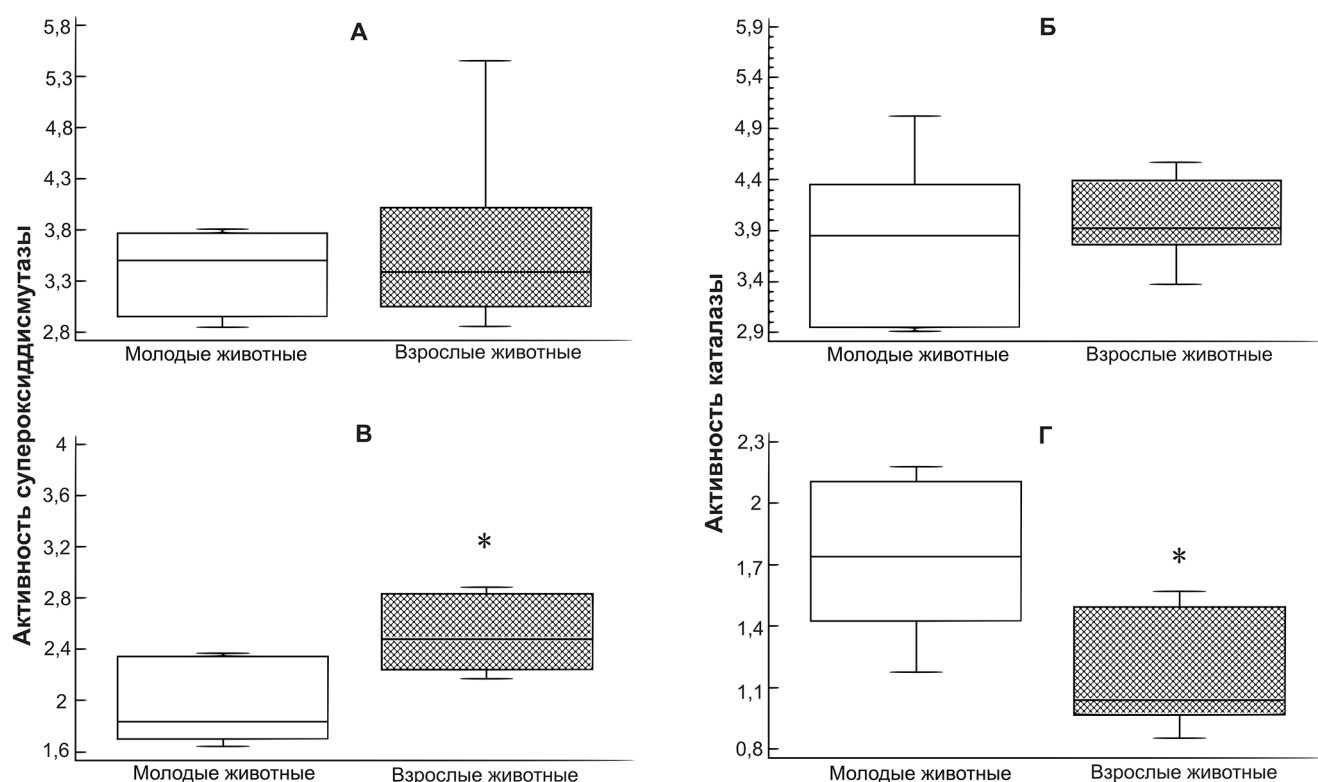


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы (А, В) и каталазы (Б, Г) в тканях печени (А, Б) и почек (В, Г) у лесных мышовок разного возраста.

Здесь и на **Рис. 2:** * – различия значимы по сравнению с молодыми животными ($p < 0,05$).

Таблица 2

Медианы значений уровня восстановленного глутатиона (GSH) и α-токоферола в органах лесной мышовки (в скобках указаны нижний и верхний квартили)

Возраст	Исследуемая ткань			
	Печень	Почки	Сердце	Скелетная мышца
GSH (мкмоль/г ткани)				
Молодые (сеголетки)	18,47 (17,29; 19,33)	11,86 (10,64; 13,46)	23,33 (21,93; 24,59)	12,92 (10,69; 13,46)
Взрослые (зимовавшие)	19,06 (16,87; 19,51)	17,72* (17,46; 22,59)	30,13* (29,14; 32,66)	14,35 (12,58; 14,64)
α-токоферол (мкг/г ткани)				
Молодые (сеголетки)	14,29 (10,35; 23,04)	7,75 (6,23; 9,85)	11,09 (9,07; 13,11)	5,68 (4,14; 7,80)
Взрослые (зимовавшие)	17,94 (12,04; 39,29)	16,20 (12,48; 20,13)	56,19* (33,18; 88,59)	12,43* (12,06; 20,37)

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с молодыми животными в тех же тканях (p < 0,05).

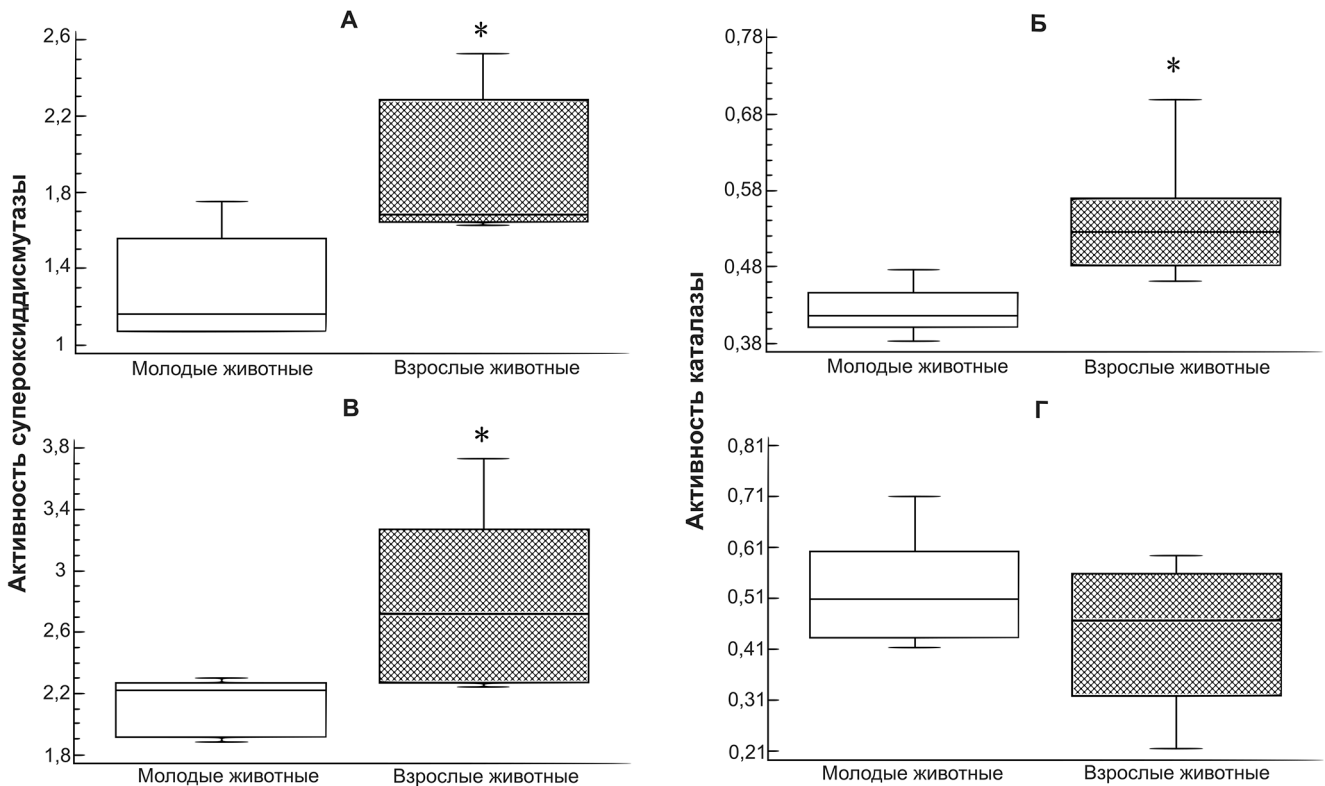


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы (А, В) и каталазы (Б, Г) в тканях сердечной (А, Б) и скелетной мышц (В, Г) у лесных мышовок разного возраста.

* – различия значимы по сравнению с молодыми животными (p < 0,05).

В скелетных мышцах тенденции к изменению изученных показателей были схожи с таковыми для тканей почек, но статистически значимые различия были обнаружены только для активности СОД (рис. 2) и уровня α-токоферола (табл. 2): у молодых животных данные показатели были ниже, чем у взрослых.

Корреляционный анализ показал наличие положительных взаимосвязей между некоторыми исследуемыми показателями лесных мышовок (табл. 3). Большинство отмеченных статистически значимых связей между показателями являлись сильными ($r \geq 0,75$). Наряду с этим не обнаружено статистически значимых связей между массой тела и уровнями антиоксидантов в тканях.

Таблица 3

Статистически значимые положительные корреляционные связи между исследуемыми показателями у лесной мышовки

Параметры корреляции	Коэффициент Спирмена	
	r	p
АТ печень – АТ сердце	0,76	0,043
АТ печень – АТ скелетная мышца	0,74	0,034
АТ почки – АТ сердце	0,9	0,011
АТ почки – АТ скелетная мышца	0,75	0,025
АТ сердце – АТ скелетная мышца	0,83	0,018
GSH почки – GSH сердце	0,89	0,029

Примечание: АТ – α-токоферол, GSH – глутатион.

Обсуждение

В ходе исследования нами были выявлены тканеспецифические возрастные изменения антиоксидантной защиты тканей зимоспящего вида грызунов — лесной мышовки. Почти во всех исследованных органах (исключение — печень) обнаружено статистически значимое увеличение активности СОД с возрастом. Реакция дисмутации супероксидных радикалов ($O_2^{\cdot-}$), катализируемая СОД, приводит к образованию пероксида водорода (H_2O_2) и кислорода. Несмотря на это, у лесной мышовки только в сердечной ткани наблюдался рост активности каталазы с возрастом. В почках, напротив, активность каталазы была ниже у взрослых животных по сравнению с молодыми. Наши результаты свидетельствуют о гетерохронности возрастных изменений антиоксидантного статуса тканей лесной мышовки и частично согласуются со сведениями, ранее полученными на других видах млекопитающих. В скелетных мышцах лабораторных крыс (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) активности антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза (ГПО) и глутатионредуктаза (ГР)), а также уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) увеличиваются в ходе онтогенеза, однако в печени активности СОД и глутатион-S-трансферазы снижались, тогда как активности ГПО и ГР повышались с возрастом [21]. Схожие данные были получены на болотной бурозубке (*Sorex palustris* Richardson, 1828), мелком полуводном млекопитающем, и обыкновенной короткохвостой бурозубке (*Blarina brevicauda* Say, 1823): активность антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, ГПО) в скелетных мышцах у взрослых животных была выше, чем у молодых, при этом с возрастом происходило увеличение содержания только одного маркера окислительного стресса — ПОЛ [3]. В дополнение к этому, у песчанок, лабораторных крыс и мышей (*Mus musculus* L., 1758) показано увеличение скорости образования $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 с возрастом [22]. Авторы предполагают [22], что, в сочетании с возможными возрастными потерями эффективности нейтрализации кислородных радикалов, старые особи должны быть более восприимчивы к воздействию АФК. Интересные результаты были получены на двух видах летучих мышей, различающихся как по средней продолжительности жизни, так и по экологии: пещерной ночницы (*Myotis velifer* J. A. Allen, 1890, продолжительность жизни 8–12 лет, насекомоядная, впадающая в зимнюю спячку) и обыкновенного вампира (*Desmodus rotundus* E. Geoffroy, 1810, 12–20 лет, не впадает в зимнюю спячку) [5]. Установлено, что активность антиоксидантных ферментов выше у *D. rotundus*, чем у *M. velifer*. Кроме того, обнаружено возрастное увеличение активности СОД и снижение активности ГПО и каталазы в тканях (печень, легкие и мозг) как

у *D. rotundus*, так и у *M. velifer* [5]. В исследовании на голых землекопах (*Heterocephalus glaber* Rüppell, 1842) и лабораторных мышах выявили следующие видоспецифические особенности антиоксидантной системы: в печени у мышей активность Мп-СОД возрастала, а активности каталазы и ГПО снижались с возрастом, при этом в печени у голого землекопа не было обнаружено возрастных изменений активности антиоксидантных ферментов и показателей окислительного стресса [22]. Кроме того, у голого землекопа базальный уровень маркеров окислительного стресса был выше, чем у лабораторной крысы и мыши [22]. Несмотря на это, голые землекопы имеют экстремальную продолжительность жизни (до 32 лет в неволе и 17 лет в дикой природе) [23].

Хорошо известно, что большое значение в адаптациях к условиям гипоксии-реоксигенации (ныряние, гибернация) у млекопитающих играют низкомолекулярные антиоксиданты. В нашем исследовании мы обнаружили возрастное увеличение уровня GSH в почках и сердце у лесной мышовки (для сердца оно было максимальным). GSH участвует во многих клеточных функциях, часто посредством регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза клеток [24]. Необходимо обратить внимание на тот факт, что содержание GSH в тканях почек и сердца зимовавшей лесной мышовки в этом исследовании было выше, чем у ранее изученных нами рыжей полевки и полевки-экономки (*Alexandromys oeconomicus* Pallas, 1776) [25]. Возможно, что высокий базальный уровень этого низкомолекулярного антиоксиданта позволяет лесной мышовке избежать окислительных повреждений при переходе от оцепенения к пробуждению и обратно в период зимней спячки.

При исследовании содержания α -токоферола у лесной мышовки выявлено повышенное накопление витамина во всех изученных органах с возрастом, для сердечной и скелетной мышцы статистически значимое. Данные по возрастным изменениям уровня α -токоферола у других видов млекопитающих достаточно противоречивы, что обусловлено целым рядом факторов (полом, видовой принадлежностью, пищевыми предпочтениями, возрастным диапазоном исследований, сезоном). Так, например, результаты исследований на лабораторных грызунах свидетельствуют о накоплении α -токоферола в тканях органов [26]. Схожие результаты были получены на насекомоядной обыкновенной бурозубке (*Sorex araneus* L., 1758), но при этом не обнаружено возрастных изменений уровня α -токоферола у растительноядной рыжей полевки, обитающей в этом же регионе [27]. Следует подчеркнуть, что содержание α -токоферола в тканях сердца зимовавшей лесной мышовки, для которой характерна эврифагия, было значительно выше, чем у рыжей полевки и обыкновен-

ной бурозубки, обитающих в Республике Карелия [27]. Сердце зимоспящих является уникальной моделью повышенной устойчивости к гипоксии [28]. Ранее было выявлено, что перестройки метаболизма у зимоспящих млекопитающих затрагивают, прежде всего, сердце — в связи с переключением энергообеспечения с углеводов как основного источника энергии на жиры. Изоферментные спектры лактатдегидрогеназы сердца лесной мышовки в летний период отличаются наибольшим содержанием анаэробной фракции лактатдегидрогеназы, что можно рассматривать как адаптивный механизм, обеспечивающий функционирование организма в условиях периодически возникающего дефицита кислорода [29].

Для зимоспящих видов млекопитающих витамин Е крайне важен, поскольку является антиоксидантом. Так у сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839) содержание α -токоферола в плазме крови увеличивается при гибернации в 3,5 раза по сравнению с периодами до и после пробуждения [12]. Авторы предполагают, что это связано с балансом высвобождения α -токоферола вместе с липопротеинами из печени и поглощением его клетками посредством эндоцитоза [12]. Кроме того, у зимоспящих летучих мышей, обитающих на Северо-Западе России, уровень α -токоферола в печени выше в период зимней спячки по сравнению с периодом летней активности [15]. У более крупных зимоспящих млекопитающих накопление жира перед спячкой сочетается с аккумуляцией в организме витамина Е [30]. В нашем исследовании, несмотря на различия в массе тела между молодыми и взрослыми мышовками, мы не обнаружили статистически значимых связей между массой тела и уровнем α -токоферола. Корреляционный анализ показал наличие положительных взаимосвязей между содержанием витамина в разных органах лесных мышовок, что может быть связано с распределением α -токоферола внутри организма.

Токоферол может защищать полиненасыщенные жирные кислоты или липиды клеточной мембраны от ПОЛ во время пробуждения от оцепенения [12]. Помимо этого, отмечают, что особое значение α -токоферол имеет при гипотермии [30, 31]. Холодоустойчивость (4°C) гепатоцитов сирийского хомяка *in vitro* зависит от рациона питания животных, используемых для культивирования клеток: диеты с высоким содержанием витамина Е (более >150 мг/кг) поддерживают большую устойчивость гепатоцитов к низким температурам по сравнению с диетами с более низким количеством витамина (менее <70 мг/кг) [30]. Интересно, что подобная диета с высоким содержанием токоферола не обеспечила устойчивость к холоду клеток печени лабораторных мышей, что указывает на видовые особенности [30]. В исследовании Кличханова и соавт. [31] обнаружено снижение разви-

тия окислительного стресса в эритроцитах при совместном внутрибрюшинном введении витаминов С (100 мг/кг) и Е (40 мг/кг) лабораторным крысам при острой умеренной гипотермии (30°C).

Различия в уровне антиоксидантной защиты между молодыми и взрослыми особями лесной мышовки можно объяснить множеством факторов, включая скорость основного обмена и экологические характеристики (например, двигательная активность, рацион питания, особенности онтогенеза и др.). Известно, что максимальная скорость потребления кислорода и удельная скорость обмена веществ у млекопитающих снижаются с увеличением массы тела [32]. Следовательно, необходимо учитывать эффект масштабирования в зависимости от массы тела. Ожидается, что более мелкое молодое животное будет обладать большей скоростью окислительного метаболизма, чем взрослое [32]. В дополнение к этому, особенности двигательной активности грызунов тесно связаны с возрастом животных и типом их питания. Молодые особи лесной мышовки при переходе к самостоятельному образу жизни приспосабливаются к новым условиям существования, активно расселяются и в то же время интенсивно растут [33]. Сеголетки лесной мышовки, по сравнению с зимовавшими особями, обладают относительно большей длиной кишечника и не отличаются от взрослых животных по индексу сердца и почек, что свидетельствует о высокой степени подвижности прибылых особей, напряженности их метаболизма и большим расходом энергетических субстратов [33]. Вполне вероятно, что именно поэтому молодые особи лесной мышовки отличаются от взрослых, как правило, более низким уровнем тканевых антиоксидантов. Также необходимо подчеркнуть, что животные были отловлены в Республике Карелия — вблизи северной границы ареала распространения. Обитание в условиях Севера требует дополнительных функциональных резервов для поддержания гомеостаза у млекопитающих.

Дискуссионным остается вопрос о том, влияет ли гибернация на продолжительность жизни млекопитающих. Предполагается, что при сниженном метаболизме риск окислительных повреждений кислородом также уменьшен. Однако межвидовые сравнения внутри систематических групп обычно приводят к выводу, что гибернация мало влияет на продолжительность жизни. Один из примеров — это продолжительность жизни представителей семейства беличьих. Самым долгоживущим является не впадающий в спячку вид белка и некоторые из видов гибернантов этой группы (например, суслики, сурки, бурундуки) [34]. В исследовании Лимана и др. [35], была показана положительная корреляция между долей времени, проведенного в оцепенении, и долголетием хомяков Брандта (*Mesocricetus brandti* Nehring, 1898). Другая группа — летучие мыши,

которые живут почти в 3,5 раза дольше, чем нелетающие млекопитающие того же размера. При этом зимоспящие летучие мыши живут в среднем на 5 лет больше негибернарующих летучих мышей [35, 36]. Однако и для не впадающих в зимнюю спячку летучих мышей характерны оцепенение в дневное время, а также пусть и не столь значительное, но значимое снижение температуры тела. Максимальная продолжительность жизни лесной мышовки в естественных условиях составляет 4 года [8], для сравнения — максимальная продолжительность жизни рыжей полевки в условиях Карелии равняется 15 месяцам [11].

Заключение

Таким образом, полученные результаты указывают на асинхронное возрастное изменение антиоксидантной защиты тканей лесной мышовки. Молодые особи характеризовались, как правило, более низким уровнем антиоксидантов по сравнению с зимовавшими, что, возможно, связано с напряженностью физиологических процессов и значительным расходом энергетических ресурсов на другие физиологические функции в данный период онтогенеза в условиях Севера — приспособление к новым условиям существования, активное расселение, интенсивный рост организма и подготовка к зимней спячке. Также необходимо подчеркнуть важную роль низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион, α -токоферол) в антиоксидантной защите тканей взрослых особей лесной мышовки.

Полученные результаты дополняют имеющиеся сведения по регуляции поддержания постоянства внутренней среды мелких зимоспящих видов млекопитающих, однако существует еще много нерешенных вопросов в этой области исследований — в частности, большое значение приобретает молекулярно-генетические механизмы активации антиоксидантной системы при переходе от оцепенения к пробуждению и обратно.

Авторы выражают признательность сотрудникам лаборатории экологической физиологии животных Института биологии КарНЦ РАН за помощь в проведении исследования. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003) и ИБВВ (№124032500016-4). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры на животных были одобрены независимым Комитетом по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН (протокол № 3 от 14 августа 2023 года) в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sohal R.S., Orr W.C. The redox stress hypothesis of aging. *Free. Radic. Biol. Med.* 2012;52(3):539–555.
2. Yang J., Luo J., Tian X., Zhao Y., Li Y., Wu X. Progress in understanding oxidative stress, aging, and aging-related diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(4):394.
3. Hindle A.G., Lawler J.M., Campbell K.L., et al. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 2010;155(4):427–434.
4. Andziak B., O'Connor T.P., Buffenstein R. Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mech. Ageing Dev.* 2005;126(11):1206–1212.
5. Conde-Perezprina J.C., Luna-Lopez A., Gonzalez-Puertos V.Y., Zenteno-Savín T., León-Galván M.Á., Königsberg M. DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*, as possible factors associated with longevity. *Age*. 2012;34(6):1473–1492.
6. Klichkhanov N.K., Nikitina E.R., Shihamirova Z.M., Astaeva M.D., Chalabov S.I., Krivchenko A.I. Erythrocytes of little ground squirrels undergo reversible oxidative stress during arousal from hibernation. *Front. Physiol.* 2021;12:730657.
7. Haase C.G., Fuller N.W., Hranac C.R., Hayman D.T.S., Olson S.H., Plowright R.K., McGuire L.P. Bats are not squirrels: revisiting the cost of cooling in hibernating mammals. *J. Therm. Biol.* 2019;81:185–193.
8. Ивантер Э.В. К популяционной экологии лесной мышовки (*Sicista betulina* Pall.) на северном пределе ареала. Сообщение II. Размножение, экологическая структура популяции, динамика численности. *Принципы экологии*. 2021;3(41):25–41.
9. Johansen K., Krog J. Diurnal body temperature variations and hibernation in the birch mouse, *Sicista betulina*. *Am. J. Physiol.* 1959;196(6):1200–1204.
10. Orr A.L., Lohse L.A., Drew K.L., Hermes-Lima M. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2009;153(2):213–221.
11. Ivanter E.V. The reproductive ecology of the bank vole *Myodes (Clethrionomys) glareolus* Schreb. In north periphery of its areal: I. sex cycles, course, dates, and intensive reproduction. *Biol. Bull.* 2020;47(5):535–547.
12. Okamoto I., Kayano T., Hanaya T., Arai S., Ikeda M., Kurimoto M. Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2006;144(1):47–56.
13. James R.S., Staples J.F., Brown J.C., Tessier S.N., Storey K.B. The effects of hibernation on the contractile and biochemical properties of skeletal muscles in the thirteen-lined ground squirrel, *Ictidomys tridecemlineatus*. *J. Exp. Biol.* 2013;216(Pt. 14):2587–2594.

14. Yin Q., Ge H., Liao C.C., Liu D., Zhang S., Pan Y. Antioxidant defenses in the brains of bats during hibernation. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152135.
15. Ilyina T.N., Baishnikova I.V., Belkin V.V. Retinol and α -tocopherol content in the liver and skeletal muscle of bats (*Chiroptera*) during hibernation and summer activity. *J. Evol. Biochem. Phys.* 2022;58(6):1697–1707.
16. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972;247(10):3170–3175.
17. Beers R.F., Sizer I.N. A spectral method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952;195(1):133–140.
18. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265–275.
19. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968;25:192–205.
20. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Сельскохозяйственная биология*. 1989;4:127–129.
21. Ji L.L., Dillon D., Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* 1990;258(4 Pt. 2):R918–R923.
22. Andziak B., O'Connor T.P., Qi W. et al. High oxidative damage levels in the longest living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell*. 2006;5(6):463–471.
23. Saldmann F., Viltard M., Leroy C., Friedlander G. The naked mole rat: a unique example of positive oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019;4502819.
24. Aoyama K., Nakaki T. Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Molecules*. 2015;20(5):8742–8758.
25. Antonova E.P., Kalinina S.N., Yakimova A.E. et al. Antioxidant defenses in tissues of four species of Arvicolinae (Rodentia, Cricetidae). *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2023;50(Suppl. 3):S428–S435.
26. Matsuo M., Gomi F., Dooley M.M. Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech. Ageing Dev.* 1992;64(3):273–292.
27. Ilyina T.N., Baishnikova I.V., Yakimova A.E., Zaitseva I.A. On the concentration of vitamins A and E in the tissues of the bank vole (*Myodes (Clethrionomys) glareolus*) and common shrew (*Sorex araneus*) inhabiting Karelia. *Adv. Gerontol.* 2024;14(1):21–27.
28. van Breukelen F., Martin S.L. The hibernation continuum: physiological and molecular aspects of metabolic plasticity in mammals. *Physiology (Bethesda)*. 2015;30(4):273–281.
29. Антонова Е.П., Сергина С.Н., Илюха В.А., Якимова А.Е. Характеристика видовых и возрастных особенностей лактатдегидрогеназной системы в тканях грызунов (Mammalia: Rodentia). *Труды Карельского научного центра РАН*. 2018;4:3–12.
30. Aneagawa D., Sugiura Y., Matsuoka Y., Sone M., Shichiri M., Otsuka R., Ishida N., Yamada K.I., Suematsu M., Miura M., Yamaguchi Y. Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived α -tocopherol. *Commun. Biol.* 2021;4(1):796.
31. Klichkhanov N.K., Ismailova Z.G., Astaeva M.D., Chalabov Sh.I. Effects of vitamins C and E on free radical processes in the blood of rats in acute moderate hypothermia. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2019;46:536–543.
32. McNab B.K. An analysis of the factors that influence the level and scaling of mammalian BMR. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2008;151(1):5–28.
33. Кухарева А.В. К экологии лесной мышовки (*Sicista betulina* Pall) на севере. *Современные проблемы науки и образования*. 2007;4:1–14.
34. Austad S.N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics. *Mech. Ageing Dev.* 2005;126(1):43–49.
35. Lyman C.P., O'Brien R.C., Greene G.C., Papafrangos E.D. Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science*. 1981;212(4495):668–670.
36. Brunet-Rossinni A.K., Austad S.N. Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology*. 2004;5(4):211–222.

Поступила в редакцию 19.03.2025

После доработки 21.05.2025

Принята в печать 12.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Age-related changes in the tissue antioxidant system of the northern birch mouse (*Sicista betulina*, Rodentia) at the northern periphery of its habitat area

E.P. Antonova^{1, 2, *} , V.A. Ilyukha^{2, 3} , A. E. Yakimova¹ , I.V. Baishnikova¹ , T.N. Ilyina¹ 

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

² Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, 33 Lenina Street, Petrozavodsk, 185910, Russia;

³ Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences Borok, Yaroslavl Oblast, Necouz Region, 152742, Russia

*e-mail: antonova88ep@mail.ru

The study was aimed at determining tissue antioxidant levels in juvenile and adult the northern birch mouse (*Sicista betulina* Pallas, 1779) at the northern periphery of its range (Republic of Karelia). Our results are indicating a mixed pattern of age-related changes in the antioxidant defense system: aging was accompanied by a decrease the catalase activity in the kidneys as well

as an increase in heart catalase activity and kidney, cardiac and skeletal muscle superoxide dismutase activity. The levels of low-molecular antioxidants – reduced glutathione (GSH) (kidneys and heart) and α -tocopherol (heart and skeletal muscle) were lower in the of the northern birch mouse young compared to adult animals, which is probably associated not only with the active growth and high mobility of the juvenile mouse during the dispersal period, but also with the stress of physiological systems due to living in the Northern conditions and preparing for hibernation. Higher levels of GSH and α -tocopherol were found in the hearts of adult northern birch mouse compared to other small mammal species of the order Rodentia living in the Republic of Karelia, which indicates the important role of low-molecular weight antioxidants in protecting tissues against oxidative injury in this species.

Keywords: *mammals, antioxidants, hibernators, aging, homeostasis, vitamin E*

Funding: This study was carried out under state assignment to Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (FMEN-2022-0003) and Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences (№124032500016-4).

Сведения об авторах

Антонова Екатерина Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: antonova88ep@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4740-2141>

Илюха Виктор Александрович – доктор биол. наук, ст. науч. сотр. Института биологии внутренних вод имени И.Д. Папанина Российской академии наук. Тел.: 8-48547-24-349; e-mail: ilyukha.62@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7085-4154>

Якимова Алина Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории зоологии Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-40; e-mail: angelina73@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9196-1808>

Баишникова Ирина Валерьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: iravbai@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5064-3731>

Ильина Татьяна Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Института биологии Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07; e-mail: ilyinatn59@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8708-7775>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.017.647+616.053+612.133

Изменения регуляции церебральных вазоактивных реакций при старении: вклад H_2S в cGMP-индуцированную дилатацию

О.П. Горшкова , 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*

Сигнальный каскад «NO (nitric oxide) → растворимая гуанилатциклаза (sGC, soluble guanylate cyclase) → циклический гуанозинмонофосфат (cGMP, cyclic guanosine monophosphate) → протеинкиназа G (PKG, protein kinase G)» играет значительную роль в дилатации сосудов, и его нарушения могут являться причиной цереброваскулярных заболеваний. Ключевым звеном сигнальной системы NO → PKG является cGMP, внутриклеточный уровень которого во многом регулируется расщепляющими его ферментами – cGMP-гидролизующими фосфодиэстеразами (PDE, phosphodiesterase). Старение сопровождается снижением скорости синтеза NO и уровня cGMP, а также повышением активности PDE. В этих условиях возможно увеличение вклада компенсаторных механизмов в активацию отдельных участков сигнального пути NO → PKG, в частности, с участием посредников, изменяющих уровень cGMP. В качестве одного из активаторов пути NO → PKG в настоящее время рассматривается сероводород (H_2S , hydrogen sulfide), который может повышать уровень cGMP в клетке путем ингибирования PDE или непосредственно взаимодействовать с cGMP, что сопровождается образованием биологически активных соединений, менее подверженных ферментативному разложению. H_2S -опосредованная активация cGMP показана в кардиомиоцитах и гладкомышечных клетках сосудов брыжейки и аорты, но в сосудах головного мозга этот механизм не изучен. Целью работы стало изучение вклада H_2S в регуляцию cGMP-индуцированной вазодилатации мозговых сосудов и изменения этого механизма регуляции вазоактивных реакций при старении. У крыс Sprague-Dawley в возрасте 4 мес. (молодые) и 18 мес. (взрослые) методом прижизненной микрофотосъемки проводили сравнительное исследование выраженности дилаторной реакции пиальных артерий на воздействие проникающего в клетки аналога cGMP – 8-Br-cGMP (8-bromine-cyclic guanosine monophosphate), а также оценивали влияние экзогенного (донор – NaHS, sodium hydrosulfide) и эндогенного H_2S на выраженность cGMP-индуцированной вазодилатации. В качестве блокатора эндогенного H_2S применяли пропаргилглицин (proparglylglycine). Показано, что у крыс в возрасте 4 мес. опосредованная H_2S регуляция индуцированной cGMP дилатации пиальных артерий выражена только у крупных артерий диаметром более 40 мкм. Старение приводит к усилению вклада эндогенного H_2S в индуцированную cGMP дилатацию пиальных артерий всех калибров и увеличению чувствительности cGMP-опосредованных реакций мелких пиальных артерий к экзогенному H_2S .

Ключевые слова: вазодилатация, оксид азота, циклический гуанозинмонофосфат, церебральные артерии, сероводород, возрастные изменения

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-3

Введение

В функционировании сердечно-сосудистой системы (ССС) значительную роль играет сигнальный каскад NO (nitric oxide) → растворимая гуанилатциклаза (sGC, soluble guanylate cyclase) → циклический гуанозинмонофосфат (cGMP, cyclic guanosine monophosphate) → протеинкиназа G (PKG, protein kinase G) [1, 2]. Многочисленные исследования показывают, что активация этого пути в сосудах

гладкомышечных клеток (ГМК) приводит к вазодилатации [3, 4]. Сосудистые ГМК – это сократительные клетки, которые регулируют кровоток, и их аномалии лежат в основе развития многих расстройств в ССС, в том числе и в возникновении цереброваскулярных заболеваний [4, 5]. Сигнальный путь NO → PKG – привлекательная мишень для разработки новых методов лечения заболеваний, приводящих к нарушению мозгового кровотока.

Одним из аспектов развития таких заболеваний является возникновение дисфункции эндотелия и связанное с ней нарушение синтеза и биодоступности NO [5]. В этих условиях наиболее простой способ активации пути $\text{NO} \rightarrow \text{PKG}$ видится в увеличении уровня NO, но клиническая значимость доноров NO ограничена [5, 6], что приводит к необходимости поиска других подходов и более детального изучения отдельных звеньев этого пути. В качестве одного из активаторов пути $\text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow \text{cGMP} \rightarrow \text{PKG}$ в настоящее время рассматривается сероводород (H_2S , hydrogen sulfide) [7–9], который может воздействовать на все его участки. Ключевым звеном сигнальной системы $\text{NO} \rightarrow \text{PKG}$ является cGMP, уровень которого влияет на величину сосудистого тонуса, атеросклеротические процессы, функционирование сосудистых ГМК после ишемических нарушений [4, 10]. Внутриклеточное содержание cGMP в значительной степени регулируется расщепляющими его ферментами – cGMP-гидролизующими фосфодиэстеразами (PDE, phosphodiesterase). H_2S , ингибируя PDE, подавляет деградацию cGMP, повышая его уровень и усиливая активацию PKG [7, 9, 11]. Кроме того, взаимодействуя с cGMP, H_2S образует менее подверженное ферментативному разложению биологически активное соединение 8-SH-cGMP (8-thiol-cyclic guanosine monophosphate) [8], тем самым повышая содержание cGMP в клетке. Наконец, H_2S может увеличивать синтез cGMP за счет стимуляции работы растворимых гуанилатциклаз и фосфорилирования эндотелиальной NO-синтазы [8, 12]. Таким образом, H_2S разными путями может активировать cGMP и увеличивать его синтез. H_2S -опосредованная активация cGMP показана в кардиомиоцитах, ГМК сосудов брыжейки, аорты и кишечника [9, 11], но в сосудах головного мозга этот механизм не изучен.

Старение сопровождается развитием сосудистой эндотелиальной дисфункции, снижением синтеза NO, уровня cGMP [13, 14] и повышением активности PDE [15]. В этих условиях роль H_2S в активации cGMP может возрастать. Однако с возрастом в эндотелии и ГМК церебральных артерий снижается уровень экспрессии участвующих в синтезе H_2S ферментов – цистатионин- γ -лиазы (CSE, cystathionine- γ -lyase) и цистатионин- β -синтазы [16, 17], а также происходит повреждение ГМК в результате окислительного стресса [18]. Эти процессы могут приводить к изменению путей H_2S -опосредованной активации cGMP в ГМК сосудов головного мозга и к изменениям в передаче сигналов по цепи $\text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow \text{cGMP} \rightarrow \text{PKG}$. Целью данного исследования было изучение вклада H_2S в регуляцию cGMP-индуцированной вазодилатации мозговых сосудов и изменения этого механизма регуляции вазоактивных реакций при старении. Проводили сравнительное исследование выраженности дилаторной реакции пиальных артерий на

воздействие проникающего в клетки аналога cGMP – 8-Br-cGMP (8-bromine-cyclic guanosine monophosphate), а также оценку влияния экзогенного и эндогенного H_2S на выраженность cGMP-опосредованной вазодилатации у 4-месячных и 18-месячных крыс.

Материалы и методы

Эксперименты поставлены на самцах крыс Sprague-Dawley в возрасте 4 мес. ($n = 13$, масса 422 ± 10 г, АД = 122 ± 7 мм рт. ст.) и 18 мес. ($n = 13$, масса 700 ± 20 г, АД = 129 ± 5 мм рт. ст.) из центра коллективного пользования «Биоколлекция Института физиологии РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральной систем» (Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург). Животные содержались по 6 особей в клетках Т4 в стандартных условиях (свободный доступ к воде и пище, стандартная диета, искусственное освещение 12 ч свет/12 ч темнота). Крыс наркотизировали зоветилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг; Virbac, Франция), после чего катетеризировали бедренную артерию для измерения среднего артериального давления (АД) инвазивным способом (датчик DTXPlus™, Argon Critical Care Systems, Сингапур). В теменной области черепа делали отверстие, твердую мозговую оболочку в пределах трепанационного окна удаляли. Изучали прижизненные реакции пиальных артерий на орошение поверхности мозга растворами используемых в эксперименте веществ, термостатируемых при 37°C. В предварительных опытах были определены концентрации и продолжительность воздействия каждого из веществ для достижения максимального эффекта с учетом возраста животных. Возрастных отличий не обнаружено. Использовались: аналог cGMP – 8-Br-cGMP (8-bromo-cGMP, sodium salt, Sigma-Aldrich, США; 10^{-4} М), воздействие 10 мин; донор экзогенного H_2S – раствор гидросульфида натрия (NaHS, sodium hydrosulfide, Sigma-Aldrich; 30 мкМ), воздействие 2 мин; блокатор фермента CSE (cystathionine- γ -lyase) – пропаргилглицин (DL-propargylglycine, JNECHEM CO, LTD, Китай; 1 мМ), воздействие 10 мин.

В начале эксперимента поверхность мозга в течение 15 мин непрерывно орошали раствором Кребса, аэрированным карбогеном (в мМ: NaCl – 120,4; KCl – 5,9; NaHCO_3 – 15,5; MgCl_2 – 1,2; CaCl_2 – 2,5; NaH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 11,5; pH 7,4), после чего фиксировали фоновое изображение сосудов. В первой серии экспериментов после записи фонового изображения раствор Кребса заменяли раствором 8-Br-cGMP и регистрировали реакцию пиальных сосудов на это вещество. Затем к раствору 8-Br-cGMP добавляли раствор NaHS и на фоне введения экзогенного H_2S регистрировали реакцию на 8-Br-cGMP. Во второй серии

экспериментов вместо раствора NaHS использовали пропаргилглицин (propargylglycine), блокатор фермента CSE (cystathionine-γ-lyase), участвующего в продукции эндогенного H₂S. Регистрировали реакции пиальных артерий на воздействие 8-Br-cGMP до и после блокирования CSE. Из эксперимента животных выводили передозировкой раствора золетила.

Изображение пильной сосудистой сети получали на экране компьютера с помощью микроскопа MC-2-ZOOM (Микромед, Россия) со встроенной цветной камерой-видеоокуляром Basler acA 4600-10uc (Германия; разрешение 14 MP, 4608 × 3288 px). Увеличение изображения (×210) вычисляли с помощью стандартного объект-микрометра. По окончании эксперимента на статичных изображениях измеряли диаметр артериальных сосудов с использованием компьютерной программы «Blood Vessel Media Analyzer» (разработчик: Denis Chouvaev, Швеция) [19].

У каждой крысы был измерен диаметр от 50 до 70 сегментов пиальной артериальной сети, которые при дальнейшем анализе рассматривались как отдельные сосуды. Чтобы установить зависимость реакций артерий от их диаметра, сосуды разделили на 3 группы: диаметром менее 20 мкм (мелкие), от 20 до 40 мкм (средние) и более 40 мкм (крупные). О количестве расширившихся артерий судили по отношению их числа к общему числу артерий в группе, выражали это отношение в процентах. Для каждого сосуда определяли степень его расширения, относя величину изменения диаметра в ответ на воздействие исследуемого вещества к диаметру сосуда перед воздействием, выражая ее в процентах. Наши предыдущие исследования [19, 20] показывают, что основным критерием реактивности пиальной сосудистой сети является изменение числа тем или иным образом прореагировавших на воздействие сосудов за счет вовлечения новых участков сети в сосудистый ответ. Степень реакции изменяется не всегда. При анализе результатов в данной работе степень расширения рассматривалась нами и как самостоятельный критерий изменения сосудистого ответа, и совместно

с изменением числа расширившихся сосудов. В последнем случае увеличение степени расширения на фоне увеличения числа дилатаций оценивалось как более значительное усиление реакции.

Данные по отдельным группам сосудов рассчитывали для каждого животного, усредняли и затем анализировали, используя пакет статистических программ Microsoft Excel 2019 и программу InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). С учетом дифференцировки сосудов по диаметрам длина каждой выборки составляла не менее 15 значений. Нормальность распределения выборки определяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Во всех случаях полученные данные подчинялись нормальному закону распределения, поэтому их статистический анализ проводили с использованием параметрических методов. Сравнение средних значений двух независимых выборок проводили, используя непарный t-тест. Результаты анализа сосудистых реакций представлены как среднее значение параметра и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Воздействие 8-Br-cGMP у крыс в возрасте 4 мес. приводило к расширению пиальных артерий. Наибольшее число дилатаций (в среднем 95%, рисунок, А) отмечено в группе крупных артерий диаметром более 40 мкм. В остальных группах расширялось в среднем около 75% артерий (рисунок, А). Степень расширения всех исследованных артерий составила в среднем около 37% (рисунок, Б). Добавление в орошающий мозг раствор донора экзогенного H₂S, раствора NaHS, у крыс этой возрастной группы не изменяло значимо число и степень расширения артерий в ответ на воздействие 8-Br-cGMP (рисунок, А, Б). Блокада участвующего в синтезе H₂S фермента CSE пропаргилглицином в среднем на 20% уменьшила число расширившихся в ответ на воздействие 8-Br-cGMP артерий диаметром более 40 мкм. Степень дилатации всех исследованных артерий в этих условиях не изменялась (таблица).

Таблица

Влияние 8-Br-cGMP на церебральную дилатацию и вклад эндогенного H₂S в cGMP-индуцированную вазодилатацию у крыс разного возраста

Диаметр сосудов, мкм:		<20		20–40		>40	
Возраст крыс, мес:		4	18	4	18	4	18
N, %	8-Br-cGMP	78,2 ± 1,7	88,5 ± 3,5**	67,4 ± 2,5	76,6 ± 2,1*	94,9 ± 3,8	86,7 ± 4,3
	8-Br-cGMP + Propargylglycine	74,7 ± 2,1	86,2 ± 1,5	61,7 ± 3,3	72,1 ± 4,6	76,2 ± 1,4###	70,1 ± 4,4#
A, %	8-Br-cGMP	30,7 ± 4,2	50,2 ± 1,2*	28,3 ± 1,3	51,5 ± 4,4*	30,7 ± 4,8	25,4 ± 0,6
	8-Br-cGMP + Propargylglycine	34,8 ± 3,1	39,5 ± 2,1#	23,2 ± 4,3	27,7 ± 1,3###	25,11 ± 2,8	19,9 ± 2,2##

Примечание: N – число дилатированных артерий (%), A – степень расширения артерий (%). 8-Br-cGMP – до блокады эндогенного H₂S, 8-Br-cGMP + Propargylglycine – на фоне блокады эндогенного H₂S пропаргилглицином. Уровень значимости различий: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ при сравнении показателей у 4- и 18-месячных крыс в каждой отдельной группе сосудов; # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ ### $p < 0,0001$ при сравнении показателей до и на фоне блокады эндогенного H₂S в каждой отдельной группе сосудов у крыс одного возраста.

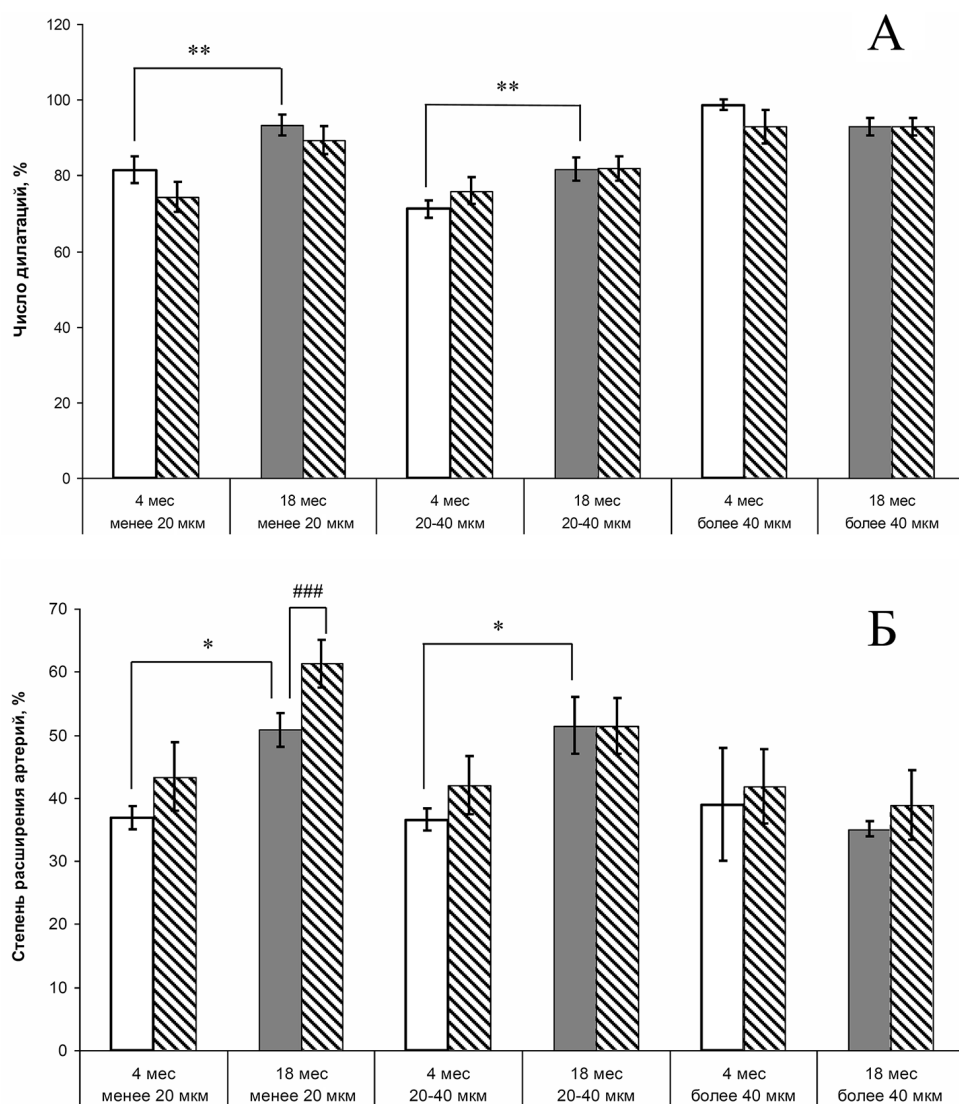


Рисунок. Влияние экзогенного H_2S на 8-Br-cGMP-опосредованную дилатацию церебральных артерий. **А** — число дилатированных артерий, % к числу артерий в группе, **Б** — степень их дилатации, % к диаметру сосуда до воздействия исследуемого вещества. 8-Br-cGMP-опосредованная дилатация у крыс в возрасте 4 мес. — белая заливка, у крыс в возрасте 18 мес. — темная заливка, 8 Br-cGMP-опосредованная дилатация на фоне введения экзогенного H_2S у крыс в возрасте 4 мес. и 18 мес. — косая штриховка. Уровень значимости различий: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — при сравнении показателей у 4- и 18-месячных крыс в каждой отдельной группе сосудов; *** — $p < 0,001$ при сравнении показателей до и на фоне введения экзогенного H_2S

У 18-месячных крыс, по сравнению с 4-месячными, число расширившихся под воздействием 8-Br-cGMP артерий диаметром ≤ 40 мкм было больше в среднем на 15% (рисунок, А). Степень расширения этих артерий в среднем на 40% превышала аналогичный показатель у 4-месячных крыс (рисунок, Б). В ответ на добавление к орошающему поверхность мозга раствору NaHS дилататорная реакция на воздействие 8-Br-cGMP изменилась только у артерий диаметром менее 20 мкм — степень их расширения увеличилась на 55% (рисунок, Б), при этом число дилатированных артерий значимо не изменилось (рисунок, А). Блокада участвующего в продукции H_2S фермента CSE пропаргилглицином уменьшала степень расширения всех исследованных артерий под влия-

нием 8-Br-cGMP: на 20% — мелких и крупных, на 46% — артерий диаметром 20–40 мкм (таблица). Число расширившихся сосудов на фоне блокады уменьшилось только у артерий диаметром более 40 мкм — на 19% (таблица).

Обсуждение результатов

В результате исследования нами установлено, что в реакциях пияльных артерий разных диаметров на воздействие 8-Br-cGMP имеются определенные различия. У молодых крыс артерии диаметром более 40 мкм расширялись в среднем в 95% случаев, артерии меньших диаметров — примерно в 75% случаев (рисунок). Это соответствует имеющимся в литературе сведениям о преобладании сигнального пути

NO→sGC→cGMP→PKG в регуляции тонуса крупных артерий [21]. В физиологических условиях уровень cGMP в клетке и сосудистые реакции, опосредованные cGMP, регулируются преимущественно NO и натрийуретическими пептидами [8]. Но, помимо этого, регулятором cGMP-индуцированных реакций может служить и H₂S [9, 11, 22]. Повышение уровня cGMP в ответ на воздействие H₂S является результатом ингибирования PDE, расщепляющих cGMP, или его непосредственного взаимодействия с cGMP с образованием биологически активных соединений, способных активировать нижележащие звенья сигнальной цепи, в частности PKG, но более устойчивых к расщеплению фосфодиэстеразами [8]. В сосудистой системе H₂S синтезируется преимущественно с участием фермента CSE [23]. В наших экспериментах ингибитор CSE пропаргилглицин у 4-месячных крыс уменьшал число расширяющихся в ответ на воздействие 8-Br-cGMP крупных пиальных артерий. Число и амплитуда дилататорных реакций сосудов диаметром менее 40 мкм не изменялись. Полученные данные указывают на существенный вклад H₂S в cGMP-индуцированную дилатацию крупных пиальных артерий у молодых крыс.

Сравнение сосудистых реакций у 4- и 18-месячных крыс позволило выявить возрастное усиление cGMP-индуцированной дилатации пиальных артерий диаметром менее 40 мкм (рисунок). У 18-месячных крыс по сравнению с 4-месячными увеличились как число расширившихся в ответ на воздействие 8-Br-cGMP артерий диаметром менее 40 мкм, так и степень их расширения (рисунок).

Как указывалось выше, у молодых крыс значительную роль в регуляции сосудистых реакций, индуцированных cGMP, играет NO. Старение сопровождается развитием окислительного стресса, в условиях которого снижаются выработка и биодоступность этого газотрансмиттера [8, 24]. Снижение вклада NO в дилататорные реакции пиальных артерий диаметром менее 40 мкм у крыс в возрасте 18 мес. показано нами в предыдущих экспериментах [25]. Наряду со снижением биодоступности NO при старении окислительный стресс способствует активации катализирующих гидролиз cGMP фосфодиэстераз и повышает их экспрессию [24, 26]. Мы полагаем, что усиление cGMP-индуцированной вазодилатации в данных условиях может быть связано с активацией компенсаторных механизмов сигнального пути cGMP с участием посредников, изменяющих уровень cGMP путем ингибирования PDE. В качестве такого посредника может выступать H₂S. Подтверждением этого служит тот факт, что в данном исследовании у 18-месячных крыс блокада фермента CSE, участвующего в продуцировании H₂S, уменьшала степень дилатации всех исследованных артерий на 20–40% и число дилатаций крупных артерий на 19% (таблица) в ответ

на воздействие 8-Br-cGMP. Наряду с этим у крыс в возрасте 18 мес. повышалась чувствительность сигнального пути cGMP к экзогенному H₂S. Введение в орошающий мозг раствор донора экзогенного H₂S в среднем в 1,5 раза увеличивало степень дилатации мелких пиальных артерий (диаметром менее 20 мкм) в ответ на воздействие 8-Br-cGMP (рисунок, Б), в то время как у 4-месячных крыс NaHS не изменял значимо cGMP-индуцированную дилатацию всех исследованных артерий.

Заключение

В представленной работе показано наличие механизма H₂S-опосредованной активации cGMP-индуцированных реакций в пиальных артериях крыс и его изменение при старении. У крыс в возрасте 4 мес. H₂S-опосредованная регуляция индуцированной 8-Br-cGMP дилатации пиальных артерий выражена только на уровне крупных артерий диаметром более 40 мкм. Старение приводит к усилению вклада эндогенного H₂S в индуцированную cGMP дилатацию пиальных артерий всех калибров. Наряду с этим с возрастом увеличивается чувствительность cGMP-индуцированных реакций мелких пиальных артерий к экзогенному H₂S. Исследования с использованием лабораторных крыс ограничивают прямую экстраполяцию полученных результатов на целостный организм человека. Однако, учитывая сопоставимость анатомического строения и организации кровообращения головного мозга [27] и принимая во внимание схожесть метаболизма [28] у лабораторных крыс и человека, результаты работы с высокой степенью вероятности могут быть экстраполированы на кровообращение в головном мозге человека. Обнаруженные изменения регуляции сосудистых реакций открывают возможность использования доноров экзогенного H₂S для проведения доклинических исследований по разработке методов коррекции возрастных изменений сигнального пути cGMP в мозговом кровотоке.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии имени И.П. Павлова РАН (№124020100111-7). 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 № 12/26 от 26.12.2022 г.). Все международные, национальные и/или институциональные принципы содержания и использования животных были соблюдены. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazuryk O., Gurgul I., Oszejca M., Polaczek J., Kieca K., Bieszczad-Żak E., Martyka T., Stochel G. Nitric Oxide signaling and sensing in age-related diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(10):1213.
2. Cai Z., Wu C., Xu Y., Cai J., Zhao M., Zu L. The NO-cGMP-PKG axis in HFpEF: From pathological mechanisms to potential therapies. *Aging Dis.* 2023;14(1):46–62.
3. Feil R., Lohmann S.M., de Jonge H., Walter U., Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: Insights from genetically modified mice. *Circ. Res.* 2003;93(10):907–916.
4. Lehnert M., Dobrowinski H., Feil S., Feil R. cGMP signaling and vascular smooth muscle cell plasticity. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2018;5(2):20.
5. Kraehling J.R., Sessa W.C. Contemporary approaches to modulating the nitric oxide-cGMP pathway in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2017;120(7):1174–1182.
6. Grześ G., Witczyńska A., Węglarz M., Wołowicz Ł., Nowaczyk J., Grześ E., Nowaczyk A. Soluble guanylyl cyclase activators-promising therapeutic option in the pharmacotherapy of heart failure and pulmonary. *Hypertension. Molecules*. 2023;28(2):861.
7. Munteanu C., Popescu C., Vlădulescu-Trandafir A.I., Onose G. Signaling paradigms of H₂S-induced vasodilation: A comprehensive review. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(10):1158.
8. Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2017;312(1):C3–C15.
9. Nalli A.D., Bhattacharya S., Wang H., Kendig D.M., Grider J.R., Murthy K.S. Augmentation of cGMP/PKG pathway and colonic motility by hydrogen sulfide. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2017;313(4):G330–G341.
10. Fu Q., Wang Y., Yan C., Xiang Y.K. Phosphodiesterase in heart and vessels: from physiology to diseases. *Physiol. Rev.* 2024;104(2):765–834.
11. Schlossmann J., Schinner E. cGMP becomes a drug target. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2012;385(3):243–252.
12. Lee H.J., Feliars D., Mariappan M.M., Sataranatarajan K., Choudhury G.G., Gorin Y., Kasinath B.S. Tadalafil integrates nitric oxide-hydrogen sulfide signaling to inhibit high glucose-induced matrix protein synthesis in podocytes. *J. Biol. Chem.* 2015;290(19):12014–12026.
13. Pourbagher-Shahri A.M., Farkhondeh T., Talebi M., Kopustinskiene D.M., Samarghandian S., Bernatoniene J. An overview of NO signaling pathways in aging. *Molecules*. 2021;26(15):4533.
14. Willkie S.E., Borland G., Carter R.N., Morton N.M., Selman C. Hydrogen sulfide in ageing, longevity and disease. *Biochem. J.* 2021;478(19):3485–3504.
15. Cesarini V., Guida E., Campolo F., Crescioli C., Di Baldassarre A., Pisano C., Balistreri C.R., Ruvoletto G., Jannini E.A., Dolci S. Type 5 phosphodiesterase (PDE5) and the vascular tree: From embryogenesis to aging and disease. *Mech. Ageing Dev.* 2020;190:111–311.
16. Calabrese V., Scuto M., Salinaro A.T., Dionisio G., Modafferi S., Ontario M.L., Greco V., Sciuto S., Schmitt C.P., Calabrese E.J., Peters V. Hydrogen sulfide and carnosine: modulation of oxidative stress and inflammation in kidney and brain axis. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(12):1303.
17. Hine C., Zhu Y., Hollenberg A.N., Mitchell J.R. Dietary and endocrine regulation of endogenous hydrogen sulfide production: implications for longevity. *Antioxid. Redox Signal.* 2018;28(16):1483–1502.
18. Predmore B.L., Alendy M.J., Ahmed K.I., Leeuwenburgh C., Julian D. The hydrogen sulfide signaling system: changes during aging and the benefits of caloric restriction. *Age (Dordr.)*. 2010;32(4):467–481.
19. Gorshkova O.P. The contribution of BK channels to ischemic/reperfusion changes in cerebral blood flow. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2024;60(Suppl. 1):S125–S134.
20. Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. Role of BK_{Ca} channels in pial-vessel dilation in rats of different ages. *Adv. Gerontol.* 2023;13(4):188–195.
21. Koeppen M., Feil R., Siegl D., Feil S., Hofmann F., Pohl U., de Wit C. cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels *in vivo*. *Hypertension*. 2004;44(6):952–955.
22. Bucci M., Papapetropoulos A., Vellecco V., Zhou Z., Zaid A., Giannogonas P., Cantalupo A., Dhayade S., Karalis K.P., Wang R., Feil R., Cirino G. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One*. 2012;7(12):e53319.
23. Chen S., Guo F., Liu X., Xi J., Xue M., Guo Y., Wen J., Dong L., Chen Z. Roles of the RhoA-ROCK signaling pathway in the endothelial H₂S production and vasodilation in rat cerebral arteries. *ACS Omega*. 2022;7(22):18498–18508.
24. Van der Linden J., Trap L., Scherer C.V., Roks A.J.M., Danser A.H.J., van der Pluijm I., Cheng C. Model systems to study the mechanism of vascular aging. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(20):15379.
25. Горшкова О.П. Особенности механизмов NO-опосредованной дилатации пилальных артерий на воздействие ацетилхолина у стареющих крыс. *Интегративная физиология*. 2022;3(3):367–377.
26. Wang J., Peng X., Lassance-Soares R.M., Najafi A.H., Alderman L.O., Sood S., Xue Z., Chan R., Faber J.E., Epstein S.E., Burnett M.S. Aging-induced collateral dysfunction: impaired responsiveness of collaterals and susceptibility to apoptosis via dysfunctional eNOS signaling. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2011;4(6):779–789.
27. Бонь Л.И., Максимович Н.Е. Морфологические представления о кровообращении головного мозга крысы. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2018;17(2):30–36.
28. Привалова И.Л., Горпинич А.Б., Озерова И.Ю., Глотова И.В., Богданова Е.И. Анализ функциональной значимости изменений ионного состава плазмы крови в экспериментальных исследованиях с использованием крыс в качестве биологических тест-систем. *Современные проблемы науки и образования*. 2018;(4):195.

Поступила в редакцию 20.02.2025

После доработки 15.05.2025

Принята в печать 07.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Changes in the regulation of cerebral vasoactive reactions and aging: the contribution of H₂S to cGMP-induced dilation

O.P. Gorshkova , V.N. Shuvaeva* 

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

*e-mail: shuvaevavn@infran.ru

Signal cascade NO→soluble guanylate cyclase (sGC)→cyclic guanosine monophosphate (cGMP)→protein kinase G (PKG) plays a significant role in vascular dilation. Its disorders can cause the development of cerebrovascular diseases. The key unit in the NO→PKG signaling system is cGMP. Intracellular cGMP levels are largely regulated by cGMP-hydrolyzing phosphodiesterase (PDE) enzymes that break down cGMP. Aging is accompanied by a decrease in NO synthesis and cGMP levels and an increase in PDE activity. Under these conditions, it is possible to increase the contribution of compensatory mechanisms of activation of individual sections of the NO→PKG signaling pathway, in particular with the participation of intermediaries that change the cGMP level. Hydrogen sulfide (H₂S) is currently considered as one of the activators of the NO→PKG pathway, which can increase cGMP levels in cells by inhibiting PDE or its direct interaction with cGMP to form biologically active compounds that are less susceptible to enzymatic break down. H₂S-mediated cGMP activation has been shown in cardiomyocytes and smooth muscle cells of mesenteric and aortic vessels, but this mechanism has not been studied in cerebral vessels. The aim of the work was to study the contribution of H₂S to the regulation of cGMP-induced vasodilation of cerebral vessels and changes in this mechanism of regulation of vasoactive reactions during aging. In Sprague-Dawley 4 (young) and 18-month-old (aging) rats, a comparative study of the pial arteries dilatation to the effect of the penetrating into cells analog cGMP — 8-Br-cGMP was performed using intravital microphotography, and an assessment of the effect of exogenous (donor — NaHS) and endogenous H₂S on the cGMP-induced vasodilation. Propargylglycine was used as a blocker of endogenous H₂S. It was shown that in 4-month-old rats, the H₂S-mediated regulation of cGMP-induced dilation of the pial arteries was expressed only at the level of large arteries with a diameter of more than 40 microns. Aging leads to an increased contribution of endogenous H₂S to cGMP-induced dilation of the pial arteries of all calibers and an increased sensitivity of cGMP-mediated reactions of small pial arteries to exogenous H₂S.

Keywords: *vasodilation, nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, cerebral arteries, hydrogen sulfide, age-related changes*

Funding: This study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (No. 124020100111-7).

Сведения об авторах

Горшкова Оксана Петровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: gorshkovao@infran.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8026-6161>

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 577.32

Молекулярное моделирование взаимодействия метиленового синего с виropорином коронавируса SARS-CoV-2

Е.П. Васюченко^{1, 2, *} , Е.Г. Холина¹ , В.А. Федоров¹ , М.Г. Страховская¹ ,
И.Б. Коваленко¹ , А.Б. Рубин¹

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

² Научно-образовательный математический центр «Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской», Псковский государственный университет, Россия, 180000, г. Псков, площадь Ленина, д. 2
*e-mail: vasyuchenko.katya@gmail.com

Виропорины являются небольшими мембранными белками оболочечных вирусов. Они играют важную роль как в жизненном цикле вируса, так и развитии патогенеза заболевания. В связи с этим, ингибирование виropоринов считается перспективной стратегией в лечении многих заболеваний, вызванных оболочечными вирусами, такими как коронавирус, вирус герпеса, вирус иммунодефицита человека, вирус Эбола и многие другие. Важным этапом поиска высокоэффективных ингибиторов таких каналов является изучение особенностей взаимодействия потенциальных противовирусных препаратов с аминокислотными остатками канала виropорина. В свою очередь, метиленовый синий является известным эффективным противовирусным агентом и широко применяется в медицинской практике. В данной работе мы провели расчеты молекулярной динамики взаимодействия метиленового синего с каналом виropорина коронавируса SARS-CoV-2 методом отбора зонтичных проб. Анализ образуемых контактов между молекулой метиленового синего и аминокислотными остатками виropорина показал, что ключевую роль в связывании играют нековалентные стэкинг-взаимодействия между системой ароматических колец метиленового синего и остатками фенилаланина, расположенными в центре канала виropорина. Полученные результаты приближают нас к пониманию механизмов противовирусного действия метиленового синего. Проведение подобных вычислительных экспериментов представляется эффективным подходом при поиске ингибиторов виropоринов.

Ключевые слова: виropорин, коронавирус, метиленовый синий, молекулярное моделирование, молекулярная динамика, броуновская динамика

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-4

Введение

Целый ряд вирусных заболеваний представляет значительный риск для общественного здравоохранения. Приоритетными для исследований и разработок считают вирусные инфекции, которые могут вызывать вспышки или пандемии [1]. Возбудителями таких инфекций являются вирус Конго-крымской геморрагической лихорадки, вирусы Эбола, Нипах, Зика, Ласса, коронавирусы. Все перечисленные вирусы объединяет наличие в их структуре дополнительной внешней липидной оболочки со встроенными гликопротеинами. К группе оболочечных относятся также вирусы гриппа и вирус иммунодефицита человека.

В XXI в. представители коронавирусов (CoV) оказались в центре внимания в связи со вспышками тяжелого острого респираторного синдрома

(SARS — Severe acute respiratory syndrome) в 2002–2003 гг. [2], ближневосточного респираторного синдрома (MERS — Middle East respiratory syndrome) в 2012 г. [3] и пандемией COVID-19 [4], которая побудила исследователей по всему миру к тщательному изучению строения и жизненного цикла ее возбудителя SARS-CoV-2. Сферические частицы коронавируса диаметром 80–120 нм окружены бислойной мембраной, липиды которой происходят из липидов клеток организма-хозяина. В мембрану оболочки коронавирусов встроены три основных структурных белка — спайковый, S; мембранный, М и оболочечный, Е [5]. Спайковые S-белки являются важнейшими функциональными структурами, обеспечивающими узнавание, связывание с рецепторами клеток хозяина, слияние мембран, вход вирусов в клетки [6, 7], в то

время как М- и Е-белки играют ключевую роль в сборке и почковании вируса [8, 9].

Эктодомены S-белков (шипы) выступают за липидный бислой на 10–20 нм, образуя характерную «корону», которой и обязана своим названием данная группа вирусов. Матрицу оболочки коронавируса образует гликозилированный структурный М-белок, который имеет три трансмембранных домена и обычно существует в форме функциональных димеров [10]. Этот белок представлен наибольшим числом копий и, взаимодействуя с другими белками оболочки и белком, формирующим нуклеокапсид (N белок), отвечает за сборку и поддержание формы и размера вирионов [11]. Когда новые вирионы собираются и отпочковываются в промежуточный компартмент эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (ERGIC – Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment), нуклеокапсид покрывается бислойной мембраной из липидов клетки-хозяина со встроенными трансмембранными вирусными белками.

Электростатическое поле оболочки SARS-CoV-2 крайне неоднородно и состоит из чередующихся областей положительного и отрицательного потенциала. Отрицательные участки электростатического потенциала генерируются в основном липидами мембраны фосфатидилинозитолом, фосфатидилсерином и кардиолипином, а также отрицательно заряженными аминокислотами спайкового белка S [12].

Небольшой (75 аминокислот) Е-белок с единственным гидрофобным доменом образует в мембранах гомопентамерные каналы, так называемые «виropорины» [13, 14]. В отличие от М-белков, виropорины в оболочке SARS-CoV-2 представлены всего несколькими копиями и преимущественно локализируются в мембранах эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и ERGIC инфицированной вирусом клетки. Липиды мембраны являются частью архитектуры каналов, образованных Е-белками, а их электрический заряд сильно влияет на ионную селективность каналов, при этом в отрицательно заряженных мембранах (например, мембраны ERGIC содержат 20% отрицательно заряженных липидов) возрастает проницаемость виropоринов для катионов [15]. Наличие ионов кальция модулирует транспортные свойства канала виropоринов через взаимодействие с заряженными липидами [16].

Ключевая роль виropоринов в процессе почкования вирионов показана в нескольких исследованиях *in vitro* [17–19]. Несмотря на то, что белок N значительно увеличивает продукцию новых вирусных частиц, для их сборки достаточно только белков Е и М [20]. Виropорины также вносят вклад в заключительный этап жизненного цикла коронавируса, на котором вновь образованные вирусные частицы включаются в секреторные пу-

зырьки и высвобождаются из инфицированной клетки. Заражение клеток Vero E6 вирусом SARS-CoV-2 приводит к подщелачиванию внутреннего содержимого ERGIC и лизосом, и это изменение pH связывают с функционированием образованных Е-белками ионных каналов [21]. Предполагают также, что виropорины SARS-CoV-2, участвуя в деацидификации лизосом, предотвращают деградацию вирусных частиц [22].

С учетом важной роли виropоринов в формировании и высвобождении вирусных частиц представляет интерес поиск и изучение потенциальных модуляторов их проводимости. С этой точки зрения, среди соединений с широким спектром антивирусной активности привлекает внимание метиленовый синий (МС). Как следует из результатов проведенного нами компьютерного моделирования взаимодействия МС с поверхностными структурами оболочки коронавируса [23], молекулы этого красителя связываются с отрицательно заряженными липидами мембраны, а также S- и Е-белками. При этом МС проявлял сродство к области с отрицательным электрическим потенциалом, которая формируется глутаматами Е-белков вокруг входа в канал виropорина SARS-CoV-2. В настоящей работе мы детально исследовали возможные локализации МС внутри канала виropорина SARS-CoV-2 методом полноатомной молекулярной динамики с использованием подхода зонтичной выборки.

Материалы и методы

Создание системы виropорина в мембране. В исследовании использовали модель виropорина, полученную ранее [24]. Молекулу МС (рис. 1) располагали над порой виropорина на расстоянии 4 нм от центра масс пяти остатков PHE26, составляющих центр поры этого пентамерного Е-белка. Белок помещали в мембрану, созданную с использованием веб-сервиса CHARMM-GUI *Membrane Builder* [25]. Мембрана имела следующий состав: 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин (POPC – 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine, 59%), 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилэтанолламин (POPE – 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylethanolamine, 20%), 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилинозитол (POPI – 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylinositol, 10%), холестерин (CHOL, 4,5%), кардиолипин (CDL2, 4,5%), пальмитоилолеоилфосфатидилсерин (POPS – palmitoyl-oleoyl phosphatidylserine, 2%). В молекулярно-динамической системе использовали силовое поле CHARMM36m и модель воды TIP3P. Для нейтрализации системы добавляли ионы калия и хлора в концентрации 0,1 М для каждого иона. Топология молекулы МС была получена с помощью программы Antechamber [26], реализованной в веб-сервисе CHARMM-GUI, в силовом поле gaff2 методом AM1-BCC. Пространственная визуализация молекулы МС пред-

ставлена на рис. 1. После минимизации системы методом наискорейшего спуска проводили ее уравнивание с постепенным снятием позиционных ограничений в программе GROMACS-2022.5 [27]. На атомы молекулы МС накладывали добавочный потенциал 10000 кДж/моль, чтобы предотвратить перемещение молекулы в растворе. Состояние системы после уравнивания представлено на рис. 1.

Отбор зонтичных проб. Исследование взаимодействия МС с каналом виропорина проводили методом полноатомной молекулярной динамики с использованием подхода зонтичной выборки. Для отбора зонтичных проб использовали программный модуль PLUMED-2.9.0 [28] для программного пакета GROMACS-2022.5 [27]. В качестве координаты реакции была выбрана координатная ось OZ, нормальная к плоскости

мембраны и направленная вдоль оси канала, с началом в центре масс пяти аминокислотных остатков (F26 в каждом из пяти мономеров Е-белка) в начальный момент времени. Положение МС фиксировали вдоль оси OZ с помощью добавочного зонтичного потенциала, тогда как в плоскости мембраны молекула могла свободно перемещаться, взаимодействуя с аминокислотными остатками Е-белка. Реакционный путь составил 8 нм и был разбит на 80 окон, в каждом из которых проводили молекулярно-динамический расчет в течение 200 нс с внешним зонтичным потенциалом 1000 кДж/моль/нм², наложенным на координату реакции. Потенциал средней силы (ПСС) рассчитывали с использованием метода анализа взвешенных гистограмм (WHAM — Weighted Histogram Analysis Method) [29], как это реализовано в программе WHAM версии 2.0.10 [30].

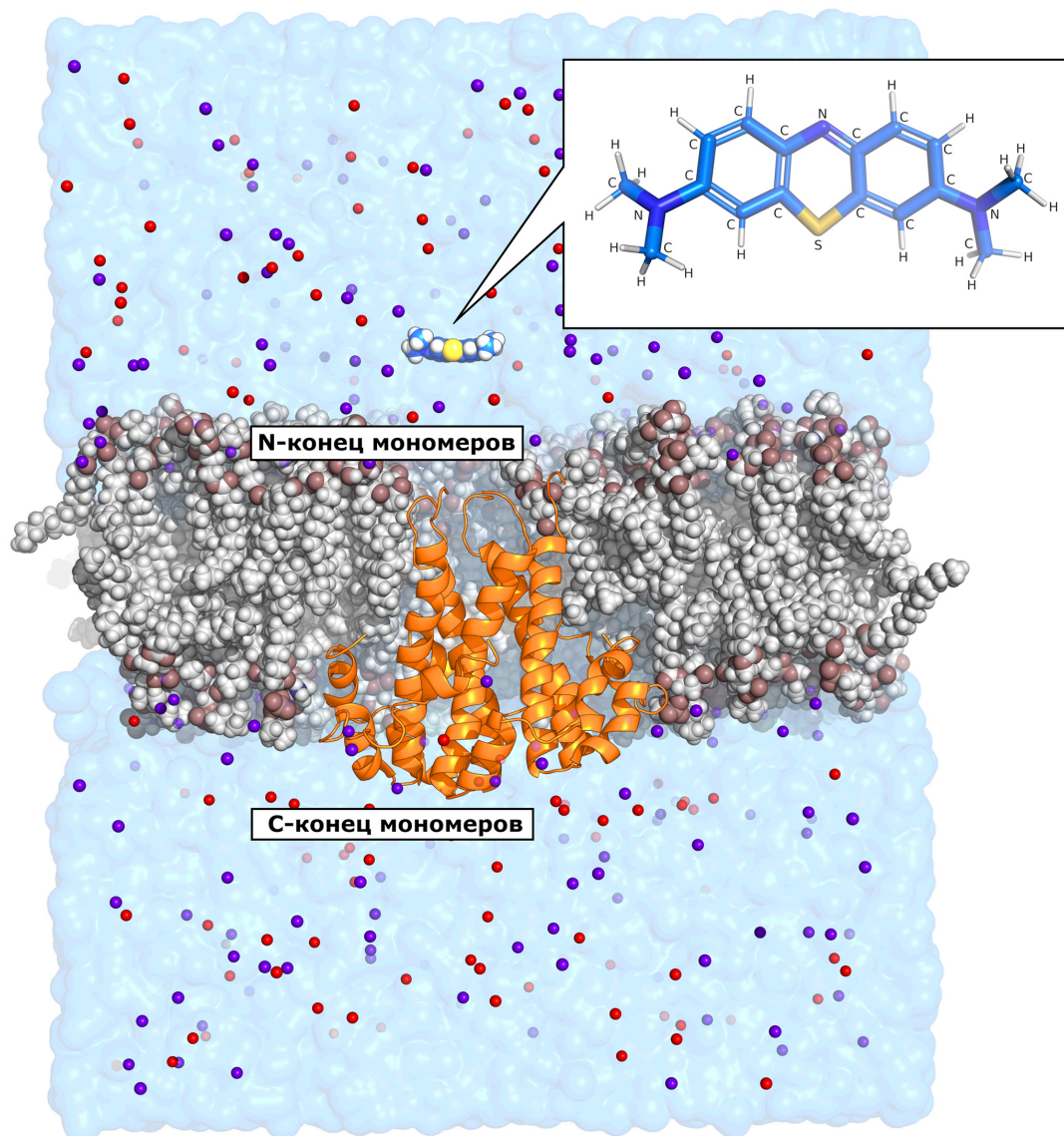


Рис. 1. Визуализация молекулярно-динамических моделей МС и виропорина в мембране. Е-белки представлены оранжевым цветом; атомы фосфатных групп липидов мембраны представлены светло-коричневыми сферами, остальные атомы — серыми сферами; ионы калия и хлора представлены фиолетовыми и красными маленькими сферами соответственно. Состояние системы показано после этапа уравнивания. Молекула МС расположена в центре первого окна зонтичной выборки.

Кластерный анализ. Для отбора структур с минимумами ПСС определяли диапазон значений координаты реакции, где значение ПСС превосходило таковое в локальном минимуме не более чем на 0,25 кДж/моль (0,1 кТ, где k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура). Из траекторий зонтичной выборки выбирали пространственные положения, в которых координата реакции находится внутри выбранного диапазона. Таким образом был получен набор пространственных положений МС для каждого из пяти локальных минимумов. Количество структур, отобранных для кластерного анализа, в каждом из пяти минимумов составило 1068, 1057, 2946, 1493 и 1244 соответственно. Кластерный анализ был проведен с помощью утилиты *gmx_cluster* методом *gromos* ($\text{cutoff} = 0,6$). Центральную структуру наиболее заселенного кластера рассматривали как типичное положение молекулы МС. Структуры визуализировали с использованием программы PyMol-2.5.4 [31], диаграммы взаимодействия молекул метиленового синего с белком получены с помощью программы BIOVIA Discovery Studio 2024 [32].

Результаты и обсуждение

Структура молекулы МС включает в себя три конденсированных ароматических кольца, центральное из которых является гетероциклом с атомами серы и азота. К каждому из боковых бензольных колец присоединено по диметиламиновой группе (рис. 1). В растворе МС чаще всего существует в виде однозарядного катиона. Как мы показали ранее [23], дальнедействующие электростатические взаимодействия обуславливают сильное начальное притяжение положительно заряженных молекул МС к поре канала. Действительно, вокруг входа в канал виropорина существует заметная кольцевая область отрицательного потенциала, обусловленного наличием двух соседних (7 и 8 а.о.) остатков глутаминовой кислоты в петлях Е-белков, выходящих в раствор, и колокализованных с виropоринами отрицательно заряженных липидов. Эта область является весьма привлекательной для молекул МС.

В настоящей работе для описания взаимодействий МС с аминокислотными остатками виropорина в минимумах ПСС из траекторий молекулярной динамики были отобраны соответствующие положения МС (рис. 2). Для типичных конформа-

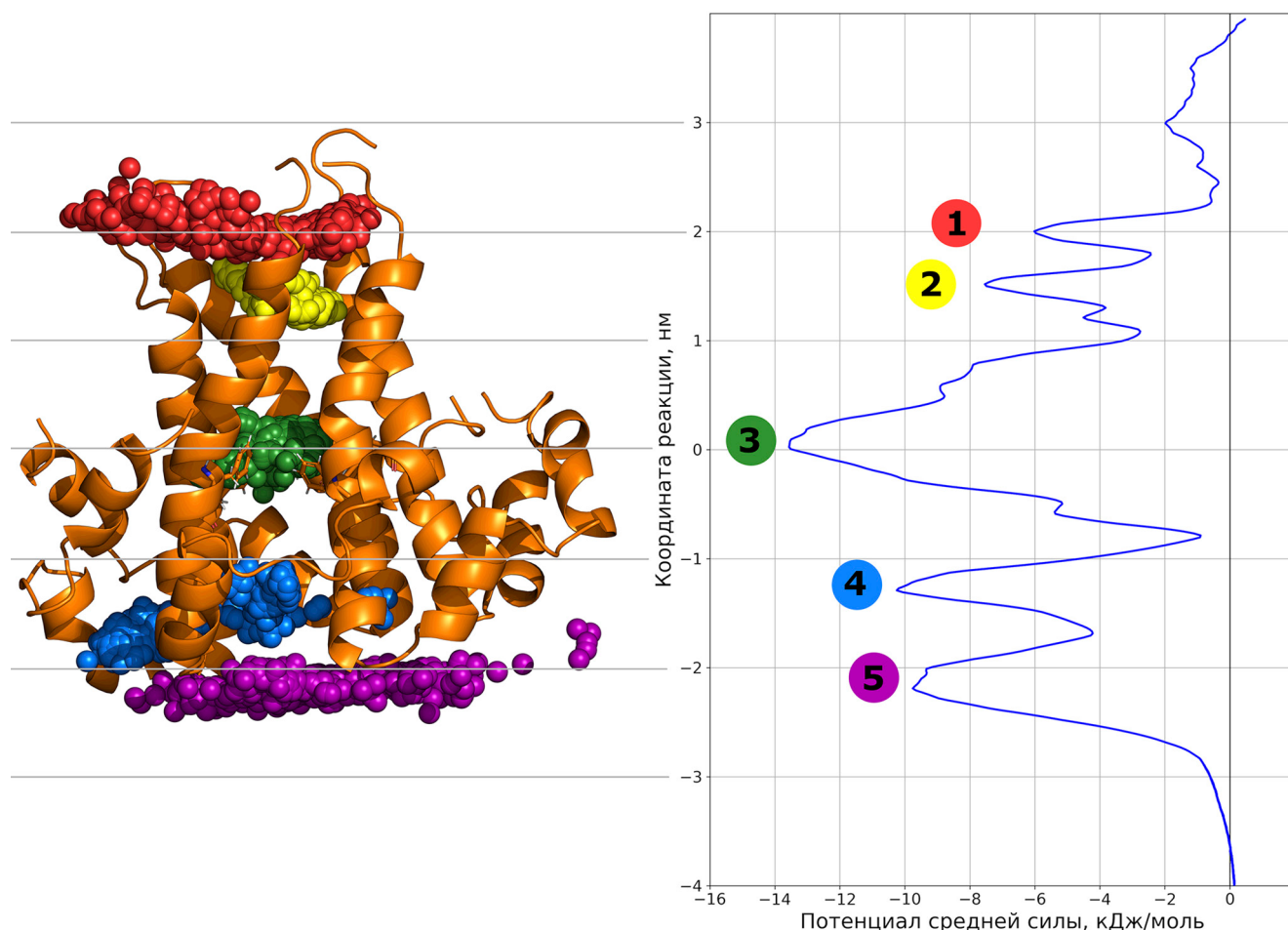


Рис. 2. Потенциал средней силы взаимодействия МС с аминокислотными остатками, формирующими канал виropорина SARS-CoV-2. Слева показан виropорин (оранжевый цвет) и центры масс молекул МС, положения которых соответствуют минимумам ПСС на правой панели.

ций МС с минимальными значениями ПСС были проанализированы взаимодействия молекул красителя с аминокислотными остатками канала виropорина. Всего было выявлено шесть типов нековалентных взаимодействий (рис. 3), в основном обусловленных наличием системы ароматических колец в структуре МС. Так, наблюдаемые π - π -стэкинг-взаимодействия обусловлены перекрыванием p -орбиталей в π -сопряженных системах МС и остатков ароматических аминокислот тирозина

и фенилаланина. При $\text{CH}-\pi$ -взаимодействиях происходит взаимодействие π -электронного облака МС и электронного облака алкильных групп аланина, валина или лейцина. Другие типы π -взаимодействий включали $S-\pi$ -, $\text{NH}-\pi$ - и $\text{OH}-\pi$ -взаимодействия. Кроме этого, существенную долю контактов между молекулами МС и аминокислотными остатками белка составляли неклассические водородные связи, образующиеся между водородами диметиламиновых групп и атомами

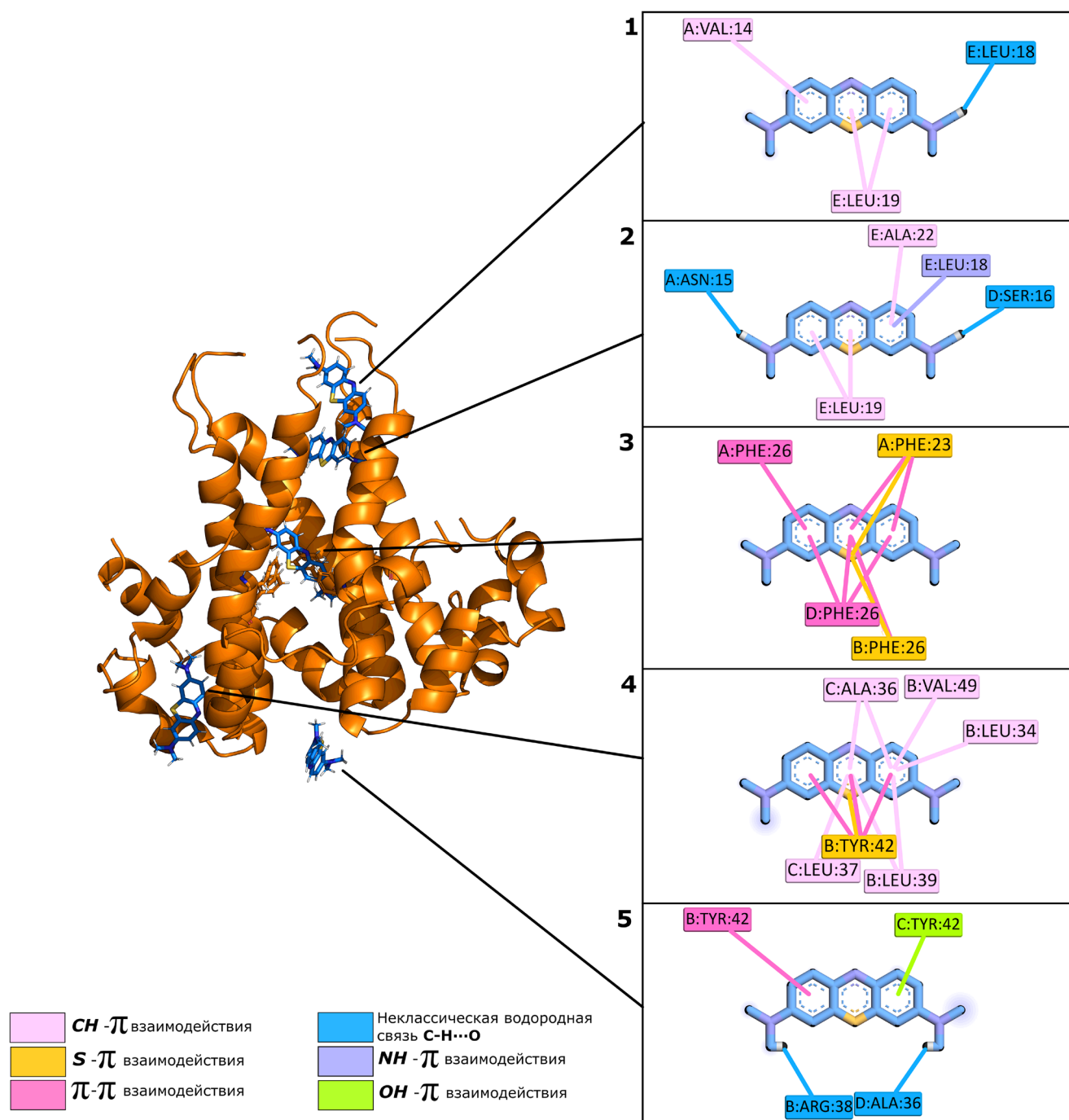


Рис. 3. Положения МС, соответствующие минимумам ПСС. МС представлен синим цветом, виropорин представлен оранжевым цветом, его конформация соответствует состоянию белка после уравнивания. Для положений в каждом минимуме представлены диаграммы взаимодействий молекулы МС с аминокислотными остатками Е-белков. В обозначении аминокислотного остатка используется цепь, которой он принадлежит, трехбуквенное обозначение типа аминокислоты и номер остатка. Положения МС в канале виropорина пронумерованы в соответствии с рис. 2.

кислорода белка. Такие связи гораздо слабее классических водородных связей, тем не менее их энергия находится в диапазоне 2–10 кДж/моль.

При анализе профиля ПСС на пути проникновения молекулы МС через пору виropорина критических энергетических барьеров не выявлено. Наблюдали пять локальных минимумов энергии, самый глубокий из которых соответствовал положению 3 МС в центре белкового канала и составлял –13,56 кДж/моль (–5,50 кТ) (рис. 2).

В области N-концов мономеров Е-белка взаимодействие МС с аминокислотными остатками выражается в наличии двух минимумов ПСС (минимумы 1 и 2 на рис. 2) с энергиями –6,01 и –7,54 кДж/моль соответственно. Энергетический барьер перехода из минимума 1 в минимум 2 и из второго в третий составляет ~4 кДж/моль (2 кТ). В первом локальном минимуме наблюдается взаимодействие молекулы МС с белком посредством СН-π-взаимодействий и слабых неклассических водородных связей, поэтому этот минимум не столь глубок и он не является препятствием для перехода МС в следующее состояние 2. Однако во втором локальном минимуме подобного рода слабых взаимодействий становится больше и МС образует связи уже с пятью аминокислотными остатками.

Когда положение МС соответствует середине поры виropорина, на кривой ПСС наблюдается глобальный минимум со значением –13,56 кДж/моль (–5,5 кТ) (положение 3 на рис. 2). Эта область канала богата ароматическими аминокислотными остатками – фенилаланинами 20, 23 и 26 в каждом из пяти мономеров пентамера виropорина. Центр масс пяти остатков F26 был принят за центр поры виropорина. Эти остатки образуют самое узкое место в канале и ответственны за закрытое и открытое состояния канала. Именно нековалентные π-π-взаимодействия молекулы МС с остатками фенилаланина определяют наличие самого глубокого минимума на кривой ПСС. При этом фенилаланин 26 D-цепи образует стэкинг-взаимодействия со всеми тремя кольцами молекулы МС, фенилаланин 23 A-цепи взаимодействует с двумя кольцами, тогда как фенилаланины 26 A- и В-цепи – только с одним кольцом. Подобные сети стэкинг-взаимодействий прочно связывают молекулу МС и осложняют ее движение внутри канала, что может приводить к ингибированию его проводимости. Энергетические барьеры перехода из этого положения в соседние минимумы довольно высокие и составляют ~12,5 кДж/моль (4,5–5 кТ).

В области выхода из канала виropорина аминокислотные остатки Е-белков взаимодействуют с МС, что выражается в наличии еще двух локальных минимумов ПСС (положения 4 и 5 на рис. 2) с энергиями –10,25 и –9,75 кДж/моль соответственно. Между ними находится небольшой энергетический барьер ~6 кДж/моль (2 кТ). Важную

роль в стэкинг-взаимодействиях МС играет ароматический аминокислотный остаток тирозина 24 В-цепи белка. Помимо этого, для положения МС в минимуме 4 профиля ПСС характерны СН-π-взаимодействия с пятью алкильными группами остатков аланина, валина и лейцина. В минимуме 5, помимо π-π-взаимодействий, имеют место ОН-π-взаимодействия и образование нетипичных водородных связей между кислородами остатков аланина 36 и аргинина 38, у которого боковая цепь, имеющая положительный заряд, экспонирована в раствор.

Энергия выхода МС из поры виropорина достаточно высокая и составляет ~10 кДж/моль (4 кТ). В петлях, соединяющих две альфа-спирали мономеров Е-белка и образующих выход из поры виropорина, присутствует пять остатков аргинина-38, экспонированных в раствор. Кольцо из пяти положительно заряженных аминокислот затрудняет выход положительно заряженной молекулы МС из канала виropорина, что выражается в довольно высоком энергетическом барьере выхода из минимума 5 на профиле ПСС.

Заключение

МС одобрен для лечения метгемоглобинемии, малярии, при отравлении цианидом. Он также проявляет вирулицидную активность, причем при достаточно низких концентрациях 1–5 мкмоль/л [33, 34] в качестве фотосенсибилизатора и эффективен против широкого спектра оболочечных вирусов при обеззараживании препаратов крови перед переливанием. В отсутствие активации светом МС также эффективен в отношении ряда вирусов, включая коронавирусы [35], однако о механизмах такого противовирусного действия красителя известно мало. В циклах репликации многих вирусов участвуют белки виropорины, которые образуют трансмембранные гидрофильные поры с определенной селективностью, модулируя таким образом проницаемость мембран [36]. В результате экспрессии виropоринов в инфицированных вирусом клетках происходят такие критические процессы, как нарушение гомеостаза важнейшего внутриклеточного мессенджера Ca^{2+} , деацидификация компартментов ERGIC и лизосом, а также повышение цитозольного pH, активация инфламмосомы, запуск апоптоза. Вирусные каналы являются признанными фармакологическими мишенями, а их потенциальные ингибиторы находятся в центре внимания исследователей. Хорошо известными соединениями, которые проявляют вирулицидную активность путем ингибирования виropорина, являются противогриппозные амноадамантаны – амантадин и римантадин [37]. С помощью методов компьютерного моделирования мы показали, что следующим этапом после первоначального электростатического контакта МС с отрицательно заряженными остатками глу-

таминовой кислоты N-конца Е-белков SARS-CoV-2 при дальнейшем погружении в канал виropорина молекулы МС вступают в множественные π -взаимодействия. Рассчитанная нами энергия этих взаимодействий ($-13,56$ кДж/моль) немного превышает энергию связывания амантадина с виropорином SARS-CoV ($\sim -12,3$ кДж/моль или $-4,9$ кТ), рассчитанную на основе экспериментально определенной константы диссоциации [38]. Это указывает на перспективу дальнейших экспериментальных исследований потенциала МС в качестве ингибитора функционирования виropоринов — в частности, методом patch-

clamp — и возможность постановки тестов на ингибирование МС репликации коронавирусов в клеточных культурах.

Статья подготовлена в рамках реализации проекта «Научно-образовательный математический центр “Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской”» (соглашение № 075-02-2025-1607 от 27 февраля 2025 г). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts> (дата обращения: 19.03.2025).
2. Peiris J.S.M., Lai S.T., Poon L.L.M., et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory. *The Lancet*. 2003;361(9366):1319–1325.
3. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., et al. Commentary: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the coronavirus study group. *J. Virol.* 2013;87(14):7790–7792.
4. Zheng S., Fan J., Yu F., et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ*. 2020;369:m1443.
5. Satarker S., Nampoothiri M. Structural proteins in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Arch. Med. Res.* 2020;51(6):482–491.
6. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.* 2016;3(1):237–261.
7. Ou X., Liu Y., Lei X., et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1620.
8. Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* 2019;16(1):69.
9. Ravi V., Saxena S., Panda P.S. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian J. Med. Microbiol.* 2022;40(2):182–186.
10. Cao Y., Yang R., Wang W., Jiang S., Yang C., Liu N., Dai H., Lee I., Meng X., Yuan Z. Probing the formation, structure and free energy relationships of M protein dimers of SARS-CoV-2. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022;20:573–582.
11. Mahtarin R., Islam S., Islam M.dJ., Ullah M.O., Ali M.A., Halim M.A. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2022;40(10):4725–4738.
12. Fedorov V., Kholina E., Khrushchev S., Kovalenko I., Rubin A., Strakhovskaya M. Electrostatic map of the SARS-CoV-2 virion specifies binding sites of the antiviral cationic photosensitizer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(13):7304.
13. Poggio E., Vallesse F., Hartel A.J.W., Morgenstern T.J., Kanner S.A., Rauh O., Giamogante F., Barazzuol L., Shepard K.L., Colecraft H.M., Clarke O.B., Brini M., Cali T. Perturbation of the host cell Ca^{2+} homeostasis and ER-mitochondria contact sites by the SARS-CoV-2 structural proteins E and M. *Cell Death Dis.* 2023;14(4):297.
14. Breiting U., Farag N.S., Sticht H., Breiting H.G. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2022;145:106185.
15. Surya W., Tavares-Neto E., Sanchis A., Queralt-Martín M., Alcaraz A., Torres J., Aguilera V. The complex proteolipidic behavior of the SARS-CoV-2 envelope protein channel: weak selectivity and heterogeneous oligomerization. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(15):12454.
16. Verdiá-Báguena C., Aguilera V.M., Queralt-Martín M., Alcaraz A. Transport mechanisms of SARS-CoV-E viroporin in calcium solutions: Lipid-dependent anomalous mole fraction effect and regulation of pore conductance. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 2021;1863(6):183590.
17. De Diego M.L., Álvarez E., Almazán F., Rejas M.T., Lamirande E., Roberts A., Shieh W.-J., Zaki S.R., Subbarao K., Enjuanes L. A Severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 2007;81(4):1701–1013.
18. Siu Y.L., Teoh K.T., Lo J., Chan C.M., Kien F., Escriou N., Tsao S.W., Nicholls J.M., Altmeyer R., Peiris J.S.M., Bruzzone R., Nal B. The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J. Virol.* 2008;82(22):11318–11330.
19. Fischer F., Stegen C.F., Masters P.S., Samsonoff W.A. Analysis of constructed E gene mutants of mouse Hepatitis virus confirms a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *J. Virol.* 1998;72(10):7885–7894.
20. Ruch T.R., Machamer C.E. The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses*. 2012;4(3):363–382.
21. Wang W.A., Carreras-Sureda A., Demareux N. SARS-CoV-2 infection alkalizes the ERGIC and lysosomes through the viroporin activity of the viral envelope protein. *J. Cell Sci.* 2023;136(6):jcs260685.
22. Miura K., Suzuki Y., Ishida K., Arakawa M., Wu H., Fujioka Y., Emi A., Morita E. Distinct motifs in the E protein are required for SARS-CoV-2 virus particle formation and lysosomal deacidification in host cells. *J. Virol.* 2023;97(10):e00426–23.
23. Kovalenko I., Kholina E., Fedorov V., Khrushchev S., Vasyuchenko E., Meerovich G., Strakhovskaya M. Interaction of methylene blue with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 envelope revealed by molecular modeling. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(21):15909.
24. Srinivasan S., Cui H., Gao Z., Liu M., Lu S., Mkandawire W., Narykov O., Sun M., Korkin D. Structural

genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins. *Viruses*. 2020;12(4):360.

25. Feng S., Park S., Choi Y.K., Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder: past, current, and future developments and applications. *J. Chem. Theory Comput.* 2023;19(8):2161–2185.

26. Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D.A. Antechamber, an accessory software package for molecular mechanical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;222(1):2001.

27. Páll S., Zhmurov A., Bauer P., Abraham M., Lundborg M., Gray A., Hess B., Lindahl E. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. *J. Chem. Phys.* 2020;153(13):134110.

28. Tribello G.A., Bonomi M., Branduardi D., Camilloni C., Bussi G. PLUMED 2: New feathers for an old bird. *Comput. Phys. Commun.* 2014;185(2):604–613.

29. Kumar S., Rosenberg J.M., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* 1992;13(8):1011–1021.

30. Grossfield A. An implementation of WHAM: the Weighted Histogram Analysis Method Version 2.0.10. *Analysis*. 2004;1–13.

31. De Lano W. The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, L.L.C. [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://pymol.org/> (дата обращения: 19.03.2025).

32. BIOVIA Discovery Studio. Dassault Systèmes. [Электронный ресурс]. 2025. URL: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> (дата обращения: 19.03.2025).

33. Eickmann M., Gravemann U., Handke W., Tolksdorf F., Reichenberg S., Müller T.H., Seltsam A. Inactivation of Ebola virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus in platelet concentrates and plasma by ultraviolet C light and methylene blue plus visible light, respectively. *Transfusion*. 2018;58(9):2202–2207.

34. Zhukhovitsky V., Shevlyagina N., Zubasheva M., Russu L., Gushchin V., Meerovich G., Strakhovskaya M. Infectivity and morphology of bovine coronavirus inactivated *in vitro* by cationic photosensitizers. *Viruses*. 2022;14(5):1053.

35. Cagno V., Medaglia C., Cerny A., Cerny T., Zwygart A.C.A., Cerny E., Tapparel C. Methylene Blue has a potent antiviral activity against SARS-CoV-2 and H1N1 influenza virus in the absence of UV-activation *in vitro*. *Sci. Rep.* 2021;11(1):14295.

36. Breiteringer U., Farag N.S., Sticht H., Breiteringer H.G. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2022;145:106185.

37. Georgiou K., Kolokouris D., Kolokouris A. Molecular biophysics and inhibition mechanism of influenza virus A M2 viroporin by adamantane-based drugs – Challenges in designing antiviral agents. *J. Struct. Biol. X*. 2025;11:100122.

38. Torres J., Maheswari U., Parthasarathy K., Ng L., Liu D.X., Gong X. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Sci.* 2007;16(9):2065–2071.

Поступила в редакцию 19.03.2025

После доработки 10.06.2025

Принята в печать 16.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Molecular modeling of the methylene blue interaction with the SARS-CoV-2 coronavirus viroporin

E.P. Vasyuchenko^{1, 2, *} , E.G. Kholina¹ , V.A. Fedorov¹ , M.G. Strakhovskaya¹ ,
I.B. Kovalenko¹ , A.B. Rubin¹ 

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

² Scientific and Educational Mathematical Center “Sofia Kovalevskaya Northwestern Center for Mathematical Research,” Pskov State University, Lenin square 2, Pskov, 180000, Russia

*e-mail: vasyuchenko.katya@gmail.com

Viroporins are small membrane proteins of enveloped viruses. They play an important role both in the life cycle of the virus and in the development of disease pathogenesis. In this regard, inhibition of viroporins is considered a promising strategy in the treatment of many diseases caused by enveloped viruses, such as coronavirus, herpes virus, human immunodeficiency virus, Ebola virus and many others. An important step in the search for highly effective inhibitors of such channels is the study of the interaction of potential antiviral drugs with the amino acid residues of the viroporin channel. In turn, methylene blue is a well-known effective antiviral agent and is widely used in medical practice. In this work, we carried out molecular dynamic calculations of the interaction of methylene blue with the viroporin channel of the SARS-CoV-2 coronavirus using the umbrella sampling method. Analysis of the contacts formed between the methylene blue molecule and the amino acid residues of viroporin showed that the key role in binding is played by non-covalent stacking interactions between the system of aromatic rings of methylene blue and the phenylalanine residues located in the center of the viroporin channel. The results obtained bring us closer to understanding the mechanisms of the antiviral action of methylene blue. Conducting such computational experiments seems to be an effective approach in the search for viroporin inhibitors.

Keywords: *viroporin, coronavirus, methylene blue, molecular modeling, molecular dynamics, Brownian dynamics*

Funding: The article was prepared within the framework of the project Scientific and Educational Mathematical Center “Sofia Kovalevskaya Northwestern Center for Mathematical Research” (agreement No. 075-02-2025-1607, February 27, 2025).

Сведения об авторах

Васюченко Екатерина Павловна — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: vasyuchenko.katya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0972-9378>

Холина Екатерина Георгиевна — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: tenarra@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5918-5084>

Федоров Владимир Андреевич — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: xbgth@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9397-1548>

Страховская Марина Глебовна — докт. биол. наук, доц. кафедры синтетической биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail: maristra@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4571-0431>

Коваленко Илья Борисович — докт. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: ikovalenko78@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4949-6591>

Рубин Андрей Борисович — академик РАН, докт. биол. наук, зав. кафедрой биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: rubin@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8354-7965>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 581.144.2:581.825.2

Участие активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в формировании аэренхимы корня ячменя в условиях гипоксии**М.В. Малыгин*** , **Л.А. Васенькова**, **М.П. Показаньева**, **И.С. Киселева** *Кафедра экспериментальной биологии и биотехнологий, Уральский федеральный университет, Россия, 620062, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19***e-mail: astett8@gmail.com*

Доступность кислорода является важным фактором в жизни растений. Его недостаток приводит к гипоксии, которая может возникнуть при избыточном увлажнении подземных частей растений. Для преодоления гипоксии у многих растений образуется лизигенная аэренхима, выполняющая функции снабжения кислородом. Механизмы образования аэренхимы не до конца ясны. В данной работе изучены анатомо-морфологические и физиолого-биохимические изменения в тканях коры корня ячменя (*Hordeum vulgare* L.) при формировании аэренхимы в условиях гипоксии, создаваемой в гидропонной среде. Дефицит кислорода тормозил рост корней, снижал интенсивность дыхания, но не оказывал влияние на развитие надземной части. На 8-е сут роста в условиях гипоксии в корнях концентрация H_2O_2 повышалась в 2,6 раза по сравнению с контролем (условия аэрации среды) и формировалась аэренхима. Накопление H_2O_2 происходило на фоне низкой активности антиоксидантных ферментов. К 28-м сут в условиях гипоксии активность разных форм пероксидаз увеличивалась, что приводило к снижению концентрации H_2O_2 в корнях до уровня контрольных значений. Сделано предположение о том, что на ранних этапах гипоксии увеличение содержания H_2O_2 служит для запуска образования аэренхимы, на более поздних этапах — усиление антиоксидантной активности приводило к нейтрализации активных форм кислорода, обеспечивая выживание корней и целого растения.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, корни, гипоксия, аэренхима, активные формы кислорода, пероксидазы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-6

Введение

Кислород является важным фактором в жизни всех аэробных организмов. Растения как фотосинтезирующие организмы наполняют атмосферу кислородом, обеспечивая жизнь на Земле. Однако в современных природных условиях растения могут сталкиваться с кислородной недостаточностью, или гипоксией [1]. В последние десятилетия все чаще фиксируются отклонения от средних многолетних значений температуры, осадков, атмосферного давления [2]. Это приводит к масштабным изменениям погоды в разных регионах, в том числе к обильным осадкам и масштабным наводнениям [2]. Все чаще происходят события, приводящие к подтоплению и переувлажнению сельскохозяйственных земель [2–4]. Известно, что в этом случае корни сельскохозяйственных растений, например, кукурузы, пшеницы, ячменя и др. испытывают гипоксию [5, 6]. Поэтому изучение влияния переувлажнения и вызванной им гипоксии на растения представляется актуальным.

При гипоксии снижается интенсивность дыхания (ИД) [7, 8], что оказывает негативное влияние на поглощение минеральных элементов корнем, поскольку значительная часть ионов поглощается растением из почвы путем активного транспорта и требует энергии. Так, при гипоксии поглощение таких элементов как калий, кальций, фосфор, азот и магний у злаков может снижаться в 2–10 раз [9]. При сильной продолжительной гипоксии снижается интенсивность фотосинтеза, что показано на кукурузе, рисе и пшенице [10, 11]. Как следствие, у злаков наблюдается уменьшение биомассы корней [11–15] и надземной части растений [10, 11, 14, 15]. У культурных растений это приводит к серьезным потерям в урожайности (более 30%) [16, 17]. Понимание процессов приспособления растений к гипоксии позволит разработать новые агротехники и агроприемы для преодоления этого стресса.

Адаптация растений к гипоксии связана с физиолого-биохимическими и морфо-анатомическими

изменениями [5, 18]. Одной из реакций на гипоксию является формирование специализированной ткани аэренхимы. Она участвует в проведении и запасании кислорода в корнях и стеблях растений при его дефиците. Формирование аэренхимы хорошо изучено с точки зрения анатомии растений. Лизигенная аэренхима образуется путем частичного лизиса клеток коры корня в результате программируемой клеточной смерти (ПКС) [6]. Этот процесс контролируется этиленом и сопряжен с синтезом активных форм кислорода (АФК) [6, 19–24] и активных форм азота (АФА) [19, 25, 26], образующихся при гипоксии на этапе образования аэренхимных лакун. Регуляторами содержания АФК и АФА являются ферменты каталазы, супероксиддисмутазы и пероксидазы [14, 19], а также такие антиоксиданты, как металлотионеины [6]. Биохимические и молекулярные механизмы участия ПКС в формировании лизигенной аэренхимы не полностью исследованы.

Для изучения развития аэренхимы в условиях длительного недостатка кислорода нами был выбран ячмень. Он широко выращивается по всему миру, в том числе в России [27]. Ячмень является чувствительным к гипоксии злаком наряду с пшеницей и овсом [28], и в условиях гипоксии у него образуется аэренхима. Особенно сильно ячмень и другие злаки страдают от дефицита кислорода на стадии проростков, что вызывает серьезный риск снижения урожайности [28].

Целью данного исследования было изучение параметров про-/антиоксидантного статуса и дыхательной способности корней ячменя при гипоксии, в процессе образования аэренхимы. Для этого искусственно создавали гипоксические условия при выращивании растений в гидропонной культуре и фиксировали образование аэренхимных лакун с помощью электронной микроскопии.

Материалы и методы

Условия выращивания. Семена ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта Памяти Чепелева для проращивания замачивали на сетках, погруженных на 0,5 см в гидропонные сосуды объемом 1 л с водопроводной водой. На 2-е сут роста проростки переносили в 3-литровые сосуды с аэрацией (контроль) и без аэрации (опыт). Фотопериод составил 16 ч/8 ч (свет/темнота), освещенность — $300 \text{ мкмоль} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, температуру поддерживали на уровне 22–25°C. Первые 7 сут проростки росли в водопроводной воде, на 8-е сут воду заменяли 50%-ным раствором Хогланда [29]. Уровень растворов поддерживали выше основания корней на 0,5 см. Раствор Хогланда в сосудах меняли каждые 5 сут. Отбор материала производили в момент образования аэренхимы (8 сут) и резкого увеличения объема лакун — на 28-е сут [30, 31].

Концентрацию кислорода в сосудах измеряли с помощью кислородомера АНИОН А7000 (НПП

«Инфраспек-Аналит», Россия). В сосудах без аэрации уровень кислорода понижался уже через 10 ч после смены раствора до $2 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$, а на следующие сутки — до $0,5\text{--}1,5 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$, что соответствует условиям гипоксии. В аэрируемых сосудах уровень кислорода был от $8,5 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$ до $10,3 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$.

Морфология проростков. Для измерения морфологических показателей отбирали по 10 контрольных и опытных растений. У каждого растения была измерена максимальная длина семенных корней и побега; определена сырая и сухая масса корней и побегов. Для определения сухой массы растения фиксировали в сухожаровом шкафу 10 мин при 105°C, а затем высушивали до постоянного веса при 70°C.

Парциальный объем аэренхимных лакун. Аэренхима интенсивнее образуется у основания корней [22, 30, 32], поэтому для микроскопических исследований у 5–6 растений отбирали фрагменты базальной части семенных корней (отступ от основания 1 см, длина фрагмента 2,5–3,0 см), фиксировали их в 2,5%-ном глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (рН 7,0). Фиксированные участки далее замораживали в жидком азоте и высушивали в лиофилизаторе Labconco FreeZone 2.5 L (Labconco, США). Лиофильно высушенные образцы использовали для сканирующей электронной микроскопии с использованием прибора EVO LS 10 (Carl Zeiss, Германия). На фотографиях отмечали анатомические структуры корня (ризодерму, кору, стелу, аэренхиму при наличии); изображения обрабатывали в программе Photoshop 2019 (Adobe, США). Для измерения проективной поверхности анатомических структур на поперечных срезах использовали программу ImageJ (NIH, США). Парциальный объем лакун вычисляли по отношению площади лакун к площади коры и выражали в процентах: $S_{\text{лакун}} \times S_{\text{коры}}^{-1} \times 100 (\%)$.

Дыхание корней. Интенсивность дыхания корней оценивали по выделению CO_2 с использованием системы для изучения газообмена растений LI-COR LI-6400XT (LiCor, США) при температуре 25°C. Измерения проводили у отобранных случайным образом 5 интактных растений каждого варианта. У каждого растения корневую систему целиком помещали в камеру прибора. После 5-минутной адаптации в темноте каждые 10 с в течение 5 мин измеряли количество выделенного CO_2 и выражали в $\text{мкмоль} \text{CO}_2 \times \text{г}^{-1} \text{сухой массы} \times \text{сек}^{-1}$.

Биохимические показатели. Пробы для определения активности ферментов отбирали из базальной части семенных корней в 5 биологических повторностях, каждая из которых была получена путем объединения 5–6 растений. Активность антиоксидантных ферментов: гваяколовой пероксидазы (ГПО) [33], бензидиновой пероксидазы (БПО) [34], аскорбатпероксидазы (АПО) [35] и каталазы (КАТ) [36] определяли по стандартным методикам. Количество супероксидного анион-

радикала измеряли в соответствии с описанной ранее методикой [37], H_2O_2 — согласно Беллин-кампи и соавт. [38] и уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) — согласно Хелз и Пакер [39].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью ANOVA с использованием критерия Тьюки для неравных объемов выборки. Статистический анализ был выполнен в программе Statistica 13 (TIBCO Software Inc., США). На рисунках представлены средние значения показателей и их стандартные ошибки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Аэренхима развивалась у растений только в условиях гипоксии (рис. 1А–Г). На 8-е сут роста ячменя проективная поверхность аэренхимных лакун в корне занимала $14,7 \pm 2,9\%$, а на 28-е сут — $23,7 \pm 1,3\%$ от проективной поверхности первичной коры ($F = 14,83$, $p < 0,001$). Гипоксия не влияла на развитие надземной части расте-

ний ячменя — длина и сухая биомасса побега не различались в контроле и опыте 8-е и 28-е сут роста растений (рис. 1). Рост корневой системы при гипоксии угнетался. В первые 8 сут длина корней была в 1,5 раза меньше, чем в контроле, а на 28-е сут — в 2,4 раза. Абсолютная скорость роста корней при аэрации среды составила $12,5 \text{ мм} \times \text{сут}^{-1}$, а без аэрации — $3,5 \text{ мм} \times \text{сут}^{-1}$. Биомасса корней при гипоксии также была ниже, чем у растений в условиях аэрации (рис. 1Д–З).

Биохимические показатели у опытных и контрольных растений разного возраста отличались друг от друга. У 8-суточных растений накопление супероксидного анион-радикала в базальной части семенных корней было выше в условиях гипоксии. У 28-суточных — как в условиях гипоксии, так и в условиях нормоксии — содержание супероксидного радикала было выше, чем в 8-суточном возрасте, при этом между вариантами различий не было (рис. 2А). Содержание H_2O_2 у контрольных растений в базальной части корня было одинаковым на 8-е сут роста ячменя ($3,7 \text{ мкмоль} \times \text{г сырой}$

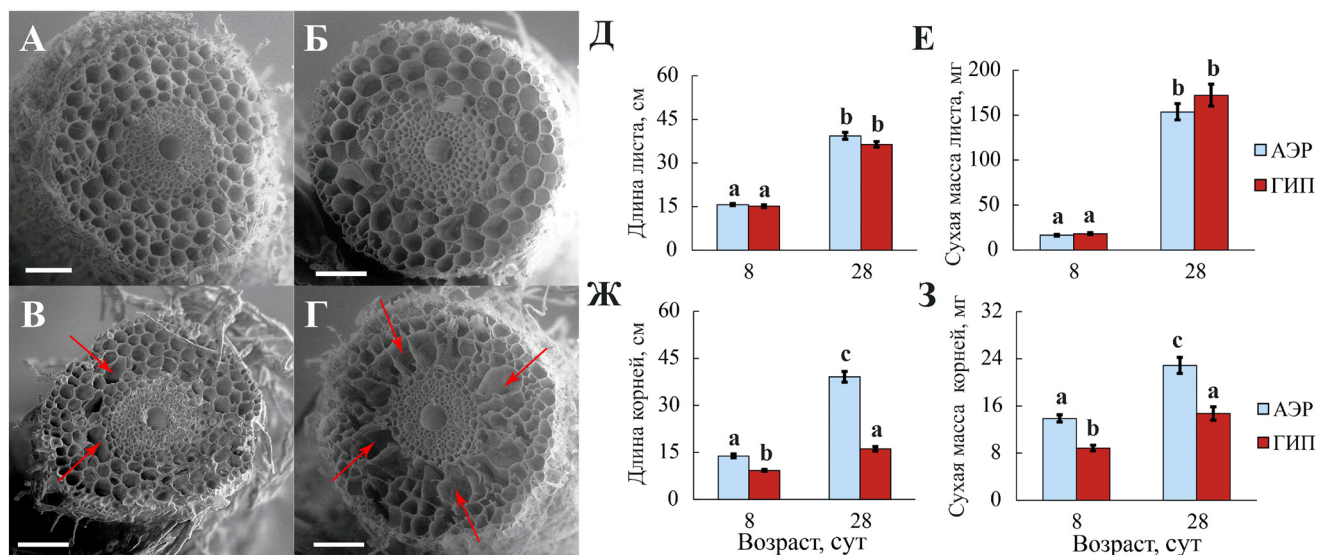


Рис. 1. Анатомо-морфологические характеристики растений ячменя в условиях гипоксии и нормоксии. Поперечные срезы базальной части корней аэрируемых (А, Б) и неаэрируемых (В, Г) растений 8- (А, В) и 28-суточного (Б, Г) возраста. Размеры и биомасса корней и побега: Д — максимальная длина листа, Е — сухая биомасса побега, Ж — максимальная длина семенных корней, З — сухая биомасса семенных корней. Разные буквы обозначают значимые различия по критерию Тьюки ($p < 0,05$). ГИП — гипоксия, условия без аэрации, АЭР — условия с аэрацией. Размер линейки — 100 мкм

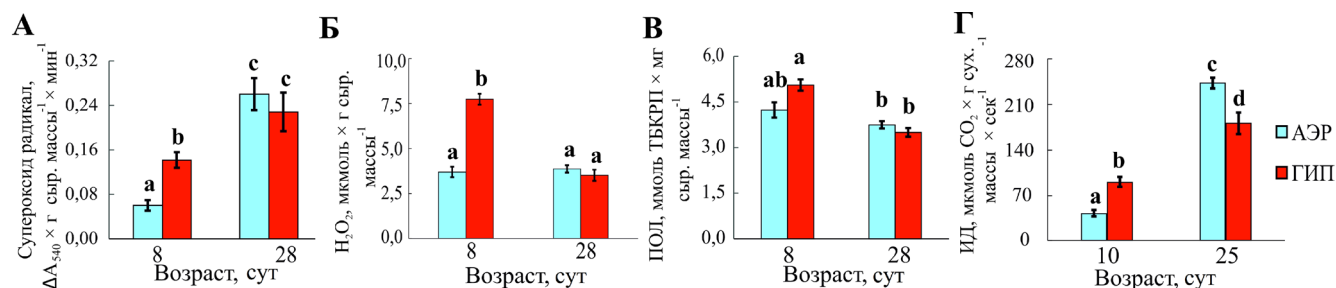


Рис. 2. Содержание супероксидного анион-радикала (А), H_2O_2 (Б), интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) (В) и интенсивность дыхания (ИД) (Г) в базальной части семенных корней ячменя. Разными буквами обозначены значимые различия по критерию Тьюки для неравных объемов выборок (Б, В, Г) ($p < 0,05$). ГИП — гипоксия, условия без аэрации, АЭР — условия с аэрацией. ТБКРП — ТБК-реагирующие продукты

массы⁻¹) и на 28-е сут роста (3,9 мкмоль × г сырой массы⁻¹). При гипоксии на 8-е сут роста растения накапливали H₂O₂ в 2,5 раза больше, чем контрольные растения (7,7 мкмоль × г сырой массы⁻¹), а на 28-е сут его содержание было на уровне контроля (3,5 мкмоль × г сырой массы⁻¹) (рис. 2Б). В корнях 8-суточных растений интенсивность ПОЛ была незначительно выше в условиях гипоксии и уменьшалась к 28-м сут роста до уровня контрольных растений (рис. 2В).

ИД корней значительно возрастала в процессе их роста. При этом в молодых корнях (10 сут) ИД в контрольном варианте была в 2 раза меньше, чем при гипоксии. В 25-суточном возрасте в условиях аэрации ИД была, напротив, выше, чем в гипоксических условиях (рис. 2Г).

На начальном этапе роста ячменя (8 сут) активность ферментов ГПО, БПО и АПО в условиях гипоксии была немного выше, чем в контроле, хотя значимыми были отличия только для АПО. К 28-м сут активность ферментов в условиях гипоксии значительно возрастала, тогда как у аэрируемых растений в корнях осталась неизменной (рис. 3А–В). Активность каталазы в корнях ячменя ни в контрольном, ни опытном варианте не детектировалась (рис. 3Г).

Обсуждение

В настоящем эксперименте гипоксия, смоделированная в условиях гидропоники без аэрации, замедляла, но не прекращала рост корней ячменя. Такой же эффект описан для пшеницы в условиях гидропоники при разных температурных режимах

[13]. Рост побегов в условиях гипоксии не подавлялся (рис. 1). Растения стремятся сохранить максимально возможную в условиях гипоксии ростовую активность корней для поддержания их поглощающей способности [9]. Формирование аэренхимы в корне необходимо для поддержания дыхания и физиологической активности клеток и тканей этого органа, что было показано, в том числе, для ячменя [6, 40, 41]. В условиях аэрации питательного раствора аэренхима не образовывалась (рис. 1). Ранее мы установили, что у проростков ячменя при росте в гидропонной среде без аэрации аэренхима образуется в 2 этапа: первые лакуны начинают формироваться на 8-е сут, а на 28-е сут происходит значительное увеличение их объемов [30]. В первые сутки формирования аэренхимы в условиях гипоксии выделение CO₂ корнями ячменя было больше, чем в аэрируемых условиях (рис. 2Г), что согласуется с данными, полученными другими авторами на пшенице [13]. Авторы полагают, что повышение интенсивности дыхания может быть связано с аккумуляцией сахаров, вызванной ослаблением поглощающей способности и ограничением роста корней, вызванных дефицитом кислорода в среде. Усиление дыхания корней в 28-суточном возрасте (рис. 2Г) совпадало по времени с началом кущения растений ячменя (рис. 1). В условиях аэрации дыхание возрастало сильнее, чем в условиях гипоксии. Такие же закономерности описаны в соответствующих обзорах для большого спектра видов растений [7, 8].

Объемы выделяемого углекислого газа определяются особенностями метаболических путей.

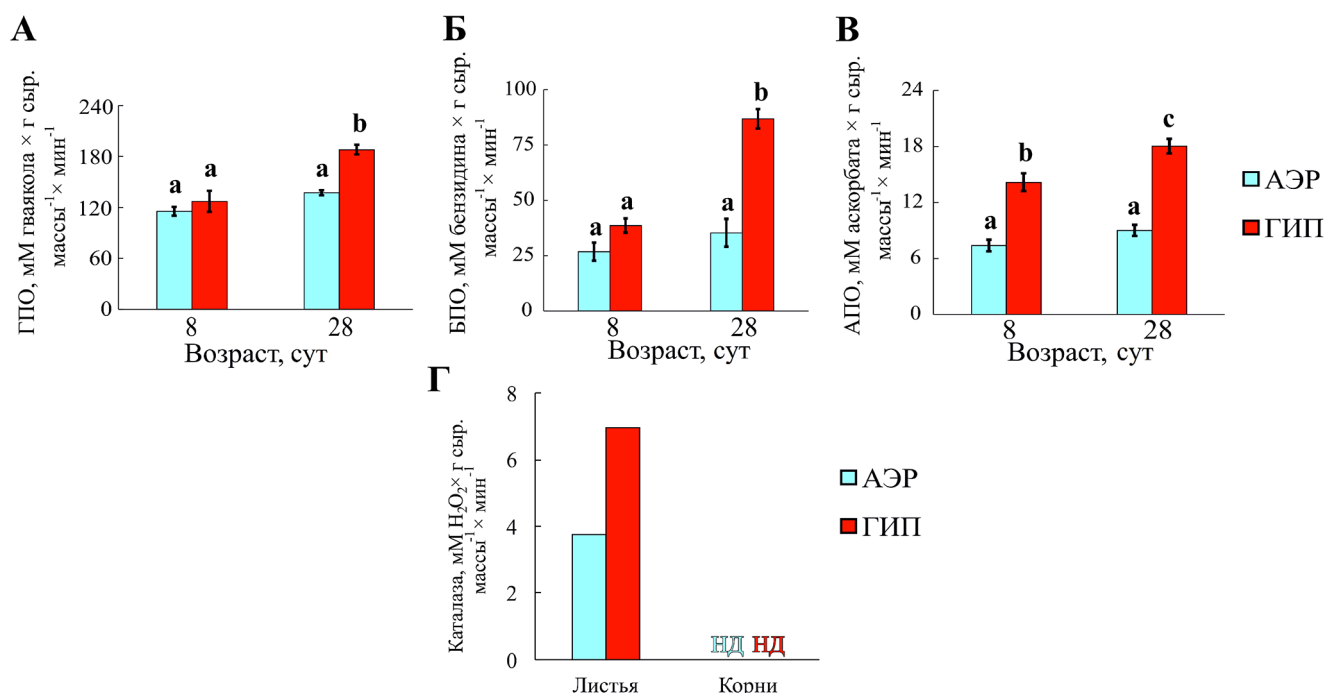


Рис. 3. Активность ферментов гваяколовой пероксидазы (А), бензидиновой пероксидазы (Б) и аскорбатпероксидазы (В) в базальной части семенных корней ячменя; активность каталазы (Г) в корнях и листьях ячменя. Разные буквы обозначают значимые различия по критерию Тьюки для неравных объемов выборок ($p < 0,05$). ГИП – гипоксия, условия без аэрации, АЭР – условия с аэрацией

Источником CO_2 являются кислородное дыхание и процессы брожения [41, 42]. При дефиците кислорода подавляется аэробный путь дыхания, при котором соотношение между дыхательным субстратом, например, глюкозой, и выделением CO_2 теоретически составляет 1:6. При этом растет интенсивность анаэробных процессов, главным образом, спиртового брожения [43], при котором на 1 моль субстрата выделяется 2 моля CO_2 . Переход с аэробного метаболизма на анаэробный в условиях гипоксии хорошо известен. Однако пока не все детали этого перехода до конца понятны [44]. Образование аэренхимных лакун при гипоксии сопряжено с уменьшением количества живых клеток коры [45], следовательно, количество CO_2 как продукта аэробного и анаэробных окислительных путей метаболизма падает.

Как известно, лизигенная аэренхима образуется под влиянием АФК, которые повреждают клеточные структуры, что приводит к лизису клеток и образованию аэренхимы [6, 18]. На 8-е сут роста ячменя, когда образуется аэренхима (рис. 1) [30, 31], у гипоксичных растений содержание $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 было значительно больше, чем у аэрируемых (рис. 2А, Б). Как известно, в условиях гипоксии после получения клеткой этиленового сигнала активируется НАДФ-Н-оксидаза (reactive burst oxidase homolog, RВОН), которая участвует в продукции супероксидного радикала [46]. Далее супероксиддисмутаза превращает $\text{O}_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 , который накапливается в тканях [14, 47]. Высокое содержание H_2O_2 в условиях гипоксии может являться причиной увеличения интенсивности ПОЛ у 8-дневных растений (рис. 2В). На данном этапе АФК могут являться не столько повреждающими клетки агентами, сколько сигнальными молекулами в индукции ПКС [6, 47] при формировании лизигенной аэренхимы.

Высокий уровень H_2O_2 в тканях корня в условиях гипоксии на 8-е сут может быть объяснен низкой активностью пероксидаз (ГПО и БПО) (рис. 3А–В). При этом активность АПО была значимо выше у гипоксичных растений, чем у контрольных (рис. 3В). Вероятно, АПО раньше начала разлагать H_2O_2 при гипоксии. У высших растений различные изоформы АПО могут встречаться в разных клеточных компартментах, включая хлоропласты, митохондрии, пероксисомы

и цитозоль, что позволяет тонко и быстро регулировать уровень H_2O_2 [48]. Показано, что АПО может действовать как регулятор сигнализации H_2O_2 [49]. На 28-е сут на этапе увеличения объемов аэренхимы количество H_2O_2 снижалось до уровня контрольных растений, что связано с увеличением активности пероксидаз (рис. 2Б, 3А–В). Активность каталазы не была обнаружена в корнях (рис. 3Г). Этот фермент имеет более высокие значения константы Михаэлиса-Ментен, чем пероксидазы [50], и, соответственно, низкую удельную активность. В работе Емельянова и др. [51] было показано, что активность каталазы в корнях значительно ниже, чем в побегах. Высокая активность пероксидаз в условиях гипоксии на 28-е сут приводила к снижению содержания H_2O_2 . В этот период заканчивалось формирование аэренхимы [30, 31], что подтверждают и другие авторы [14, 22]. Можно полагать, что АФК служат для запуска процесса образования аэренхимы и стресс-ответа клетки. В условиях продолжительной гипоксии активация антиоксидантных ферментов приводила к снижению содержания АФК.

Заключение

Таким образом, в условиях продолжительной гипоксии рост и дыхание корней были подавлены, что приводило к снижению метаболических и энергогенерируемых процессов при дефиците кислорода. На 8-е сут эксперимента у опытных растений в корнях появлялась аэренхима, которая обеспечивала приток кислорода в орган. Образование аэренхимы в этот период было связано с накоплением $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , которые затем утилизировались антиоксидантными ферментами. Вероятно, АФК играли сигнальную роль при формировании аэренхимы. На более поздних этапах развития ячменя (28-е сут) количество H_2O_2 снижалось до уровня контроля, хотя аэренхима продолжала увеличиваться в размерах. Таким образом, можно предположить, что H_2O_2 являлся индуктором образования аэренхимы, но не контролировал дальнейшее увеличение ее объемов.

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

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. van Dongen J.T., Licausi F. Oxygen sensing and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015;66(1):345–367.
2. Zhang S., Zhou L., Zhang L., Yang Y., Wei Z., Zhou S., Yang D., Yang X., Wu X., Zhang Y., Li X., Dai Y. Reconciling disagreement on global river flood changes in a warming climate. *Nat. Clim. Change.* 2022;12(12):1160–1167.
3. Bailey-Serres J., Lee S.C., Brinton E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* 2012;160(4):1698–1709.

4. Кошкин Е.И., Андреева И.В., Гусейнов Г.Г. Влияние глобальных изменений климата на продуктивность и устойчивость сельскохозяйственных культур к стрессорам. *Агрохимия.* 2019;(12):83–96.
5. Чиркова Т.В. *Физиологические основы устойчивости растений.* СПб: Изд-во С.-Петер. Ун-та; 2002. 244 с.
6. Takahashi H., Yamauchi T., Colmer T.D., Nakazono M. Aerenchyma formation in plants. *Low-oxygen stress in plants: Oxygen sensing and adaptive responses to hypoxia.* Eds.

- J.T. van Dongen and F. Licausi. Vienna: Springer Vienna; 2014:247–265.
7. Loreti E., Perata P. The many facets of hypoxia in plants. *Plants*. 2020;9(6):745.
 8. Jethva J., Schmidt R.R., Sauter M., Selinski J. Try or die: dynamics of plant respiration and how to survive low oxygen conditions. *Plants*. 2022;11(2):205.
 9. Colmer T.D., Greenway H. Ion transport in seminal and adventitious roots of cereals during O₂ deficiency. *J. Exp. Bot.* 2011;62(1):39–57.
 10. Bragina T.V., Drozdova I.S., Ponomareva Y.V., Alekhin V.I., Grineva G.M. Photosynthesis, respiration, and transpiration in maize seedlings under hypoxia induced by complete flooding. *Dokl. Bot. Sci.* 2002;384(1):274–277.
 11. Mustrup A., Albrecht G. Tolerance of crop plants to oxygen deficiency stress: fermentative activity and photosynthetic capacity of entire seedlings under hypoxia and anoxia. *Physiol. Plant.* 2003;117(4):508–520.
 12. Feng K., Wang X., Zhou Q., Dai T., Cao W., Jiang D., Cai J. Waterlogging priming enhances hypoxia stress tolerance of wheat offspring plants by regulating root phenotypic and physiological adaption. *Plants*. 2022;11(15):1969.
 13. Araki H., Hossain M.A., Takahashi T. Waterlogging and hypoxia have permanent effects on wheat root growth and respiration. *J. Agron. Crop Sci.* 2012;198(4):264–275.
 14. de Souza K.R.D., de Oliveira Santos M., Andrade C.A., da Silva D.M., Campos N.A., Alves J.D. Aerenchyma formation in the initial development of maize roots under waterlogging. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2017;29(4):165–175.
 15. Zeng F., Konnerup D., Shabala L., Zhou M., Colmer T.D., Zhang G., Shabala S. Linking oxygen availability with membrane potential maintenance and K⁺ retention of barley roots: implications for waterlogging stress tolerance. *Plant Cell Environ.* 2014;37(10):2325–2338.
 16. de San Celedonio R.P., Abeledo L.G., Miralles D.J. Identifying the critical period for waterlogging on yield and its components in wheat and barley. *Plant Soil.* 2014;378(1):265–277.
 17. Liu K., Harrison M.T., Ibrahim A., Manik S.M.N., Johnson P., Tian X., Meinke H., Zhou M. Genetic factors increasing barley grain yields under soil waterlogging. *Food Energy Secur.* 2020;9(4):e238.
 18. van Dongen J.T., Licausi F. *Low-oxygen stress in plants: oxygen sensing and adaptive responses to hypoxia*. Vienna: Springer Vienna; 2014. 426 pp.
 19. Wany A., Gupta K.J.. Reactive oxygen species, nitric oxide production and antioxidant gene expression during development of aerenchyma formation in wheat. *Plant Signaling Behav.* 2018;13(2):e1428515.
 20. Steffens B., Steffen-Heins A., Sauter M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Front. Plant Sci.* 2013;4:179.
 21. Tong C., Hill C.B., Zhou G., Zhang X.-Q., Jia Y., Li C. Opportunities for improving waterlogging tolerance in cereal crops-physiological traits and genetic mechanisms. *Plants (Basel)*. 2021;10(8):1560.
 22. Xu Q.T., Yang L., Zhou Z.Q., Mei F.Z., Qu L.H., Zhou G.S. Process of aerenchyma formation and reactive oxygen species induced by waterlogging in wheat seminal roots. *Planta*. 2013;238(5):969–982.
 23. Yamauchi T., Watanabe K., Fukazawa A., Mori H., Abe F., Kawaguchi K., Oyanagi A., Nakazono M. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. *J. Exp. Bot.* 2014;65(1):261–273.
 24. Шиков А.Е., Чиркова Т.В., Емельянов В.В. Функции активных форм кислорода в растительных клетках в норме и при адаптации. *Экол. ген.* 2021;19(4):343–363.
 25. Basu S., Kumari S., Kumar A., Shahid R., Kumar S., Kumar G. Nitro-oxidative stress induces the formation of roots' cortical aerenchyma in rice under osmotic stress. *Physiol. Plant.* 2021;172(2):963–975.
 26. Wany A., Kumari A., Gupta K.J. Nitric oxide is essential for the development of aerenchyma in wheat roots under hypoxic stress. *Plant Cell Environ.* 2017;40(12):3002–3017.
 27. Food and agricultural organization. FAOSTAT [Электронный ресурс]. 2023. URL: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/QCL> (Дата обращения: 05.05.2023).
 28. Setter T.L., Waters I. Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant Soil.* 2003;253(1):1–34.
 29. Schneider H.M., Wojciechowski T., Postma J.A., Brown K.M., Lücke A., Zeisler V., Schreiber L., Lynch J.P. Root cortical senescence decreases root respiration, nutrient content and radial water and nutrient transport in barley. *Plant Cell Environ.* 2017;40(8):1392–1408.
 30. Malygin M., Kiseleva S. Aerenchyma formation in seminal roots of *Hordeum vulgare* in hydroponic conditions. *Biol. Comm.* 2024;69(3):136–148.
 31. Малыгин М.В., Киселева И.С. Развитие аэренхимальных лакун в корнях *Hordeum vulgare* в условиях гидропоники. *Биомика*. 2022;14(3):234–237.
 32. Yamauchi T., Tanaka A., Tsutsumi N., Inukai Y., Nakazono M. A Role for auxin in ethylene-dependent inducible aerenchyma formation in rice roots. *Plants*. 2020;9(5):610.
 33. Maehly A.C. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis*. Ed. R. Glick. N.-Y.: Interscience Publishing, Inc.; 1954:357–424.
 34. Goldfischer S., Essner E. Further observation on the peroxidatic activities of microbodies (peroxisomes). *J. Histochem. Cytochem.* 1969;17(10):681–685.
 35. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981;22(5):867–880.
 36. Aebi H. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. H.U. Bergmeyer. N.-Y.: Academic Press; 1974:673–680.
 37. Chaitanya K.S.K., Naithani S.C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn.f. *New Phytol.* 1994;126(4):623–627.
 38. Bellincampi D., Dipierro N., Salvi G., Cervone F., De Lorenzo G. Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated *rolB* gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol.* 2000;122(4):1379–1386.
 39. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968;125(1):189–198.
 40. Семихатова О.А., Чиркова Т.В. Физиология дыхания растений. СПб: Изд-во С.-Петерб. Ун-та; 2001. 224 с.
 41. Armstrong W. Aeration in higher plants. *Adv. Bot. Res.* 1979(7):225–332.
 42. Armstrong W., Armstrong J. Plant internal oxygen transport (diffusion and convection) and measuring and modelling oxygen gradients. *Low-oxygen stress in plants: oxygen sensing and adaptive responses to hypoxia*. Eds. J.T. van Dongen and F. Licausi. Vienna: Springer Vienna; 2014:267–297.

43. Voesenek L.A.C.J., Bailey-Serres J. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytol.* 2015;206(1):57–73.
44. van Veen H., Triozzi P.M., Loreti E. Metabolic strategies in hypoxic plants. *Plant Physiol.* 2025;197(1):kia564.
45. Saengwilai P., Nord E.A., Chimungu J.G., Brown K.M., Lynch J.P. Root cortical aerenchyma enhances nitrogen acquisition from low-nitrogen soils in maize. *Plant Physiol.* 2014;166(2):726–735.
46. Yamauchi T., Yoshioka M., Fukazawa A., Mori H., Nishizawa N.K., Tsutsumi N., Yoshioka H., Nakazono M. An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *The Plant Cell.* 2017;29(4):775–790.
47. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(2):141–154.
48. Li S. Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher plants: more than a simple antioxidant enzyme. *Redox Biol.* 2023;64:102789.
49. Maruta T., Sawa Y., Shigeoka S., Ishikawa T. Diversity and evolution of ascorbate peroxidase functions in chloroplasts: more than just a classical antioxidant enzyme? *Plant Cell Physiol.* 2016;57(7):1377–1386.
50. Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004;(61):192–208.
51. Емельянов В.В., Ласточин В.В., Приказюк Е.Г., Чиркова Т.В. Активность каталазы и пероксидазы в растениях пшеницы и риса в условиях аноксии и постаноксической аэрации. *Физиол. раст.* 2022;69(6):675–690.

Поступила в редакцию 30.10.2024

После доработки 04.06.2025

Принята в печать 18.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Reactive oxygen species and antioxidant enzymes participate in the formation of aerenchyma in barley root under hypoxia

M.V. Malygin* , L.A. Vasenkova, M.P. Pokazanieva, I.S. Kiseleva 

Chair of Experimental Biology and Biotechnology, Ural Federal University, 19 Mira str., Ekaterinburg, 620062, Russia

*e-mail: astett8@gmail.com

Molecular oxygen is an important factor in plant life. Its deficiency leads to hypoxia, which can occur with excessive moisture of the underground parts of plants. In response to hypoxia, many plants form lysigenous aerenchyma, which performs the functions of oxygen supply. The mechanisms of aerenchyma formation are not entirely clear. Our work describes the anatomical, morphological, physiological and biochemical changes in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) during the formation of aerenchyma under hypoxia in hydroponic conditions. Oxygen deficiency inhibited root growth and reduced the intensity of respiration rate in them, but did not affect the development of the aboveground organs. Under hypoxic conditions aerenchyma in roots was formed on the 8th day, which was associated with the 2.6-fold increase in the amount of H_2O_2 compared to the control. The low activity of antioxidant enzymes led to the high H_2O_2 level. By the 28th day under hypoxic conditions, the activity of benzidine, guaiacol and ascorbate peroxidases increased, which led to a decrease in the H_2O_2 concentration. We suppose, that the increase of H_2O_2 concentration in roots triggered the formation of aerenchyma at the early stages of their growth (day 8). Later, antioxidant enzymes utilized reactive oxygen species, ensuring the survival of the roots under hypoxic conditions.

Keywords: *Hordeum vulgare*, roots, hypoxia, aerenchyma, reactive oxygen species, peroxidases

Сведения об авторах

Малыгин Михаил Вячеславович — аспирант кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Уральского федерального университета. Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: astett8@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4602-2224>

Васенькова Людмила Александровна — студентка Уральского федерального университета. Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: ludmilavasenkova02@mail.ru

Показаньева Мария Павловна — магистрант Уральского федерального университета, тел.: Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: m.pokazanieva@yandex.ru

Киселева Ирина Сергеевна — к.б.н., зав. кафедрой экспериментальной биологии и биотехнологий Уральского федерального университета, тел.: Тел.: 8-343-389-97-28; e-mail: irina.kiseleva@urfu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8709-5203>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 633.18+631+575.1

Идентификация генов энергии прорастания *AG* у дигамплоидных андрогенных растений риса

Н.Г. Черткова^{1, 2, *} , П.И. Костылев² , А.В. Усатов¹ , Н.В. Калинина¹ ¹ Южный федеральный университет, Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, д. 194;² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Аграрный научный центр «Донской», Россия, 347740, Ростовская область, г. Зерноград, ул. Научный городок, д. 3

*e-mail: tycik17082012@gmail.com

Рис играет огромную роль в питании населения мира. В России, как в Европе и Америке, рис в основном высевают прямым посевом, а в Азиатских странах применяют рассадную технологию. После прямого посева следует затопление поля, которое может привести к низкому проценту всходов и гибели молодых растений. С другой стороны, затопление рисовых чеков помогает в борьбе с сорными растениями, грызунами. Несмотря на то, что рис — это растение-гидрофит, вода может приводить к гипоксии или даже аноксии, способствуя угнетению молодых побегов. В целом большинство сортов риса на ранних стадиях развития в условиях водного стресса имеют низкую выживаемость, поэтому необходимо проводить скрининг генотипов и отбирать селекционный материал, способный выдерживать стрессовые условия. Одним из факторов толерантности к условиям водного стресса является энергия прорастания *AG* (*anaerobic germination*), представляющая собой сложный признак, контролируемый несколькими генами, картированными на разных хромосомах. Зарубежные ученые выделили сорта, обладающие генами энергии прорастания *AG* (Khao Hlan On, Mazhan Red и другие). В нашей стране на данный момент мало сортов с генами устойчивости к анаэробным условиям. В настоящее время с помощью QTL (quantitative trait locus) изучено небольшое количество местных сортов и популяций на толерантность к анаэробным условиям, поэтому необходимо расширить исследования большого количества образцов для отбора устойчивых генотипов. Целью настоящего исследования стало проведение скрининга дигамплоидных андрогенных растений риса на наличие генов энергии прорастания *AG1* и *AG2*, а также отбор перспективных генотипов, представляющих особый интерес для селекционной работы. В качестве исходного материала использовали 25 растений регенерантов, полученных методом культуры пыльников *in vitro*, из четырех гибридов, родительскими линиями которых являлись доноры энергии прорастания (Khao Hlan On), устойчивости к глубоководному затоплению (Inbara-3, IR-64) и высокопродуктивные российские сорта (Контакт, Магнат, Новатор). Молекулярно-генетический анализ проводился с применением молекулярных маркеров *AG1* (qAG-9-2) и *AG2* (qAG-7-1). В общей сложности ген *AG1* идентифицировали в 17 линиях риса, ген *AG2* — в 11 линиях, а оба гена — в 9 линиях риса (4641/1, 4641/2, 4641/3, 4641/4, 4641/6, 4641/8, 4641/9, 4641/10, 5010/4). Лабораторный опыт на устойчивость дигамплоидных линий к анаэробному стрессу выявил образцы с высокой энергией прорастания. Отобраны перспективные дигамплоидные андрогенные растения риса в качестве исходного материала для селекции.

Ключевые слова: рис, метод *in vitro*, энергия прорастания, гены *AG1* и *AG2*, дигамплоидные андрогенные растения риса, анаэробный стресс

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-7

Введение

Рис (*Oryza sativa* L.) — это вторая по площади возделывания в мире зерновая и продовольственная культура [1]. В нашей стране, как в Европе и Америке, рис в основном высевают прямым посевом (ПП), в Азиатских странах применяют рассадную технологию посева. Затопление рисовых

чеков, плохо выравненные поля и плохой дренаж при ПП могут привести к низкому проценту всхожести семян, а также гибели молодых растений риса. Однако длительное глубокое затопление помогает в борьбе с сорными растениями, грызунами [2]. Повышение уровня воды в рисовых чеках является экологическим стресс-фактором, которое

может ограничивать рост, развитие растений риса, приводя к серьезным потерям урожая. Несмотря на то, что растения риса являются гидрофитами, вода может приводить к гипоксии или даже аноксии, что предотвращает функционирование ферментов для расщепления углеводов и выработки энергии, необходимой для роста растений [3, 4]. В целом большинство сортов риса на ранних стадиях развития в условиях водного стресса имеют плохую всхожесть и выживаемость [1]. Использование MAS-технологий (marker-assisted selection) позволяет проводить скрининг большого количества генотипов за короткое время и отбирать линии, способные выдерживать длительное затопление во время прорастания, что значительно снижает гибель молодых растений и повышает урожайность, а также помогает бороться с сорной растительностью [2].

Одним из факторов толерантности к условиям водного стресса является энергия прорастания *AG* (*anaerobic germination*), представляющая собой сложный признак, контролируемый несколькими генами, картированными на разных хромосомах [5–7]. Маккилл и Куш в своих исследованиях выяснили, что толерантность к анаэробным условиям водного стресса у риса является целостным полигенным признаком, который обусловлен генами, контролирующими огромное количество физиологических и биохимических процессов, происходящих внутри растения [8]. Действие таких процессов позволяет растению удлинять стебель при низком уровне кислорода и ускорять газообмен в условиях его недостатка [4]. Основные локусы QTL (quantitative trait locus) толерантности к условиям водного стресса у риса обнаружены и картированы на разных хромосомах и обозначены как *AG1* и *AG2*.

Ангаджи и др. [9, 10] при проведении скрининга тысячи образцов риса, выявили несколько местных сортов, имеющих в геноме гены энергии прорастания *AG* (Khao Hlan On, Mazhan Red и другие). В сорте Khao Hlan On идентифицировано пять QTL, из них самый большой картирован на длинном плече хромосомы 9 (*qAG–9–2*). У сорта Mazhan Red идентифицировано шесть значимых QTL: на хромосомах 2, 5, 6 и 7, а самые крупные QTL обнаружены у сорта Nanhі на хромосоме 7 (*qAG–7–1*) [2, 11].

В России на данный момент мало сортов с генами устойчивости к анаэробным условиям. В настоящее время с помощью QTL изучено небольшое количество местных сортов и популяций на толерантность к анаэробным условиям, поэтому необходимо расширить исследования большого количества образцов для отбора устойчивых генотипов. Главным преимуществом MAS-технологий в сравнении с традиционными методами селекции является быстрый скрининг генотипов, сокращение селекционного процесса и повышение степени на-

дежности оценки селекционного материала [12]. Сочетание традиционных методов селекции с фундаментальными — например, андрогенеза *in vitro* — позволяет ускорить селекционный процесс и получить генетически уникальное гомозиготное потомство (дигаплоиды), которое может обладать высоким потенциалом урожайности и устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам среды. Объединив MAS-технологии и метод культуры пыльников *in vitro*, можно быстро получить уникальные линии с генами устойчивости к абиотическим стресс-факторам. В нашем предыдущем исследовании с применением биотехнологических методов были получены регенерантные растения риса. Исходным материалом являлись гибриды, родительскими линиями, которых были донорные растения с генами энергии прорастания и российские высокоурожайные сорта (реципиенты) [13].

Целью исследования стало проведение скрининга дигаплоидных андрогенных растений риса на наличие генов энергии прорастания *AG1* и *AG2*, а также отбор перспективных генотипов, представляющих особый интерес для селекционной работы.

Материалы и методы

Первый этап исследования включал отбор растительного материала в теплице с 25 линий риса, полученных методом культуры пыльников *in vitro* в лаборатории клеточной селекции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Аграрный научный центр «Донской» в 2023 г. (Комбинация 4641 (Inbara-3 × Контакт) × Khao Hlan On — 14 растений; комбинация 4565 (IR-64 × Магнат) — 2 растения; комбинация 5009 (Inbara-3 × Новатор) × Контакт — 3 растения и комбинация 5010 (Inbara-3 × Новатор) × Контакт — 6 растений). Родительскими линиями являлись доноры энергии прорастания Khao Hlan On (Мьянма), устойчивости к глубоководному затоплению Inbara-3 (Индонезия), IR-64 (Филиппины) и российские сорта (Контакт, Магнат, Новатор). Второй этап исследования заключался в выделении геномной ДНК из высечек зеленых листьев с помощью детергента СТАВ (ЦТАБ — цетилтриметиламмонийбромид), который позволяет получать чистую растительную ДНК для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Объем реакционной смеси для амплификации составлял 25 мкл: 5 мкл Sybr Green (5×; Евроген, Россия), 1 мкл F-прайма, 1 мкл R-прайма (общая концентрация праймеров в конечной реакционной смеси 0,4 мкМ), 15 мкл деонизированной воды и 3 мкл ДНК (с концентрацией 100 нг). Амплификацию проводили в термоциклере Rotorgene 6000 (Corbett Research, Австралия). Амплификационные продукты подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле. Гель фотодокументировали в трансиллюминаторе под ультрафиолетовым светом с помощью видеосистемы GelDoc 2000 (BioRad, США).

Электрофореграммы анализировали при помощи программы Bio-Rad ImageLab 6.0. Для ПЦР-анализа использовали отобранные по литературным данным и базе данных www.ncbi.nih.gov маркеры *AG1* (*qAG-9-2*) и *AG2* (*qAG-7-1*) [1, 9], синтезированные ЗАО «Евроген» (Россия). Маркеры имели следующие нуклеотидные последовательности праймеров: *AG1* F 5'–GTATGGCGAGACCCTACAGACC–3', R 5'–GACCCACTTAATGTGTCTACAAGG–3'; *AG2* F 5'–GGGTGGAGTGTAATAATAGCAAGC–3', R 5'–AACACGTCCAAAGTCACAGAGC–3'.

Заключительный этап исследования состоял в проверке достоверности полученных с помощью ПЦР-анализа результатов. Для этого в лабораторных условиях провели опыт по проращиванию зерен, полученных от дигиплоидных андрогенных растений риса, под слоем воды в пробирках [14]. Воздушно-сухие семена в количестве 5 шт. помещали в пробирку высотой 15 см, заливали дистиллированной водой глубиной 10 см и инкубировали в культуральной комнате при температуре 25–26°C с освещенностью более 5000 люкс и фотопериодом 16/8 ч [15]. Динамику роста фиксировали на 5-е, 7-е, 11-е и 14-е сут измерением coleoptile. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Excel пакета STATISTICA 6. Проводили расчет стандартного отклонения и коэффициента вариации.

Результаты

Молекулярные технологии позволяют проследить передачу генов от родительских линий к гибридным растениям. Практически любой ген, locus могут быть маркированы, поскольку существует большое количество специфических маркеров, в том числе и для генов устойчивости к абиотическим и биотическим факторам среды у растений риса [16].

В наших исследованиях дигиплоидные андрогенные растения риса мы проанализировали на наличие генов энергии прорастания *AG1* и *AG2*. Тестирование с помощью молекулярных маркеров показало следующие результаты, представленные на рис. 1 и 2. В качестве примера, на рис. 1 маркер гена *AG1* инициировал амплификацию фрагментов молекулярной массы порядка 235 п.н., что соответствует литературным данным. Результаты молекулярно-генетического анализа продемонстрировали наличие гена *AG1* в 17 линиях и в донорных сортах Inbara-3 и Khao Hlan On. Маркер гена *AG2* инициировал амплификацию фрагментов с длинной ампликона порядка 110 пн. В качестве примера, на рис. 2 ген *AG2* визуализировался в 10 генотипах. По результатам скрининга, основанном на ПЦР-анализе, выявлены образцы, несущие в себе гены *AG1* и *AG2* (табл. 1). В общей

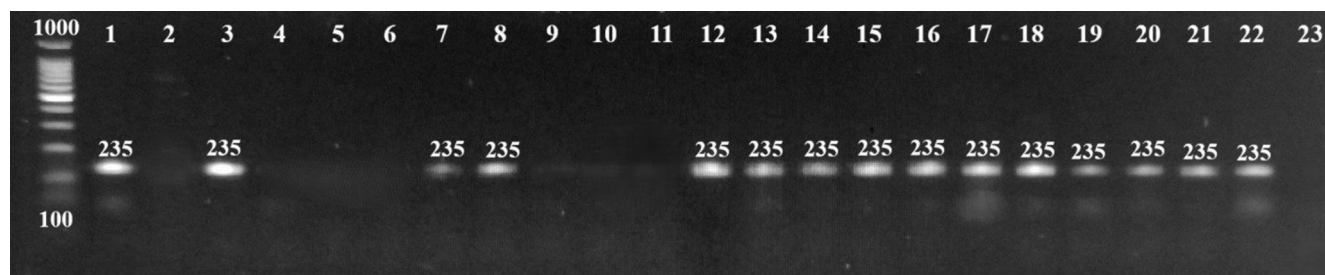


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК андрогенных линий риса с маркером гена *AG1*

Примечание: * М – маркер молекулярного веса 50+ п.н. DNALadder («Евроген», Россия); №1 – Inbara-3, №2 – IR-64, №3 – Khao Hlan On (донорные сорта); №4 – Контакт; №5 – Новатор; №6 – Магнат (российский сорта риса без гена *AG1*); №7 – 23 – регенерантные линии риса; №7–4641/1; №8–4641/2; №12–4641/3; №13–4641/4; №14–4641/5; №15–4641/6; №16–4641/7; №17–4641/8; №18–4641/9; №19–4641/10; №20–4641/14; №21–4641/15; №22–5010/1

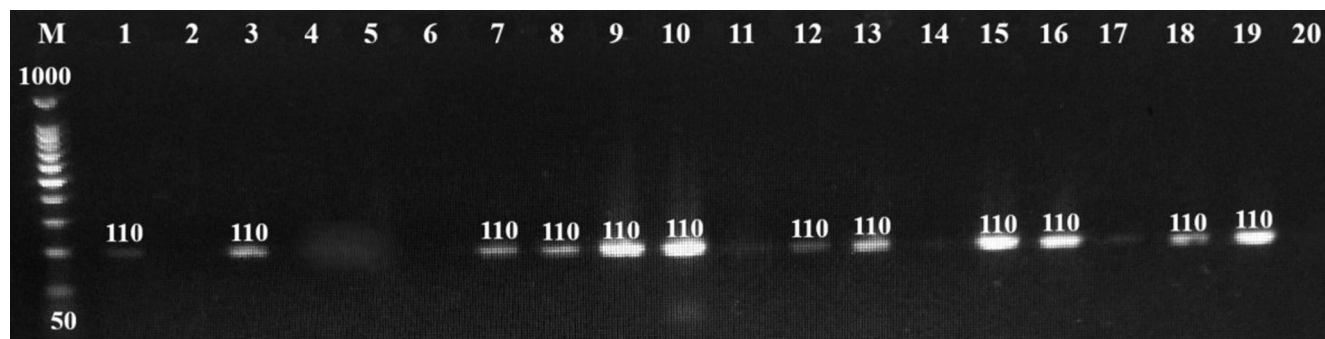


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК андрогенных линий риса с маркером гена *AG2*

Примечание: * М – маркер молекулярного веса 50+ п.н. DNALadder («Евроген», Россия); №1 – Inbara-3, №2 – IR-64, №3 – Khao Hlan On (донорные сорта); №4 – Контакт; №5 – Новатор; №6 – Магнат (российский сорта риса без гена *AG2*); №7 – 23 – регенерантные линии риса; №7–4641/1; №8–4641/2; №9–4641/3; №10–4641/4; №12–4641/6; №13–4641/8; №15–4641/9; №16–4641/10; №18–4641/12; №19–5010/4

сложности ген *AG1* идентифицировали в 17 линиях риса, ген *AG2* – в 11 линиях, а оба гена – в 9 линиях риса (4641/1, 4641/2, 4641/3, 4641/4, 4641/6, 4641/8, 4641/9, 4641/10, 5010/4).

Заключительный этап состоял в исследовании морфофизиологического ответа, полученного от дигапloidных растений риса семенного материала на действие водного стресса. Из 25 растений семенной материал был получен только от 17 генотипов, так как некоторые регенеранты оказались гапloidными (стерильными). Скрининг дигапloidных линий риса показал следующие результаты, представленные на рис. 3.

Таблица 1

Наличие генов *AG1* и *AG2* в регенерантных линиях риса

Линия	<i>AG1</i>	<i>AG2</i>	Линия	<i>AG1</i>	<i>AG2</i>
4641/1	+	+	4641/15	+	–
4641/2	+	+	5010/1	+	–
4641/3	+	+	5010/2	+	–
4641/4	+	+	5010/3	+	–
4641/5	+	–	5010/4	+	+
4641/6	+	+	5010/5	–	–
4641/7	+	–	5010/6	–	–
4641/8	+	+	5009/1	–	–
4641/9	+	+	5009/2	–	+
4641/10	+	+	5009/3	+	–
4641/11	–	–	4565/1	–	–
4641/12	–	+	4565/2	–	–
4641/14	+	–			

Примечание: «+» ген, унаследованный от зарубежных донорных сортов Khao Hlan On и Inbara-3; «–» ген от отечественных сортов Контакт, Новатор, Магнат.

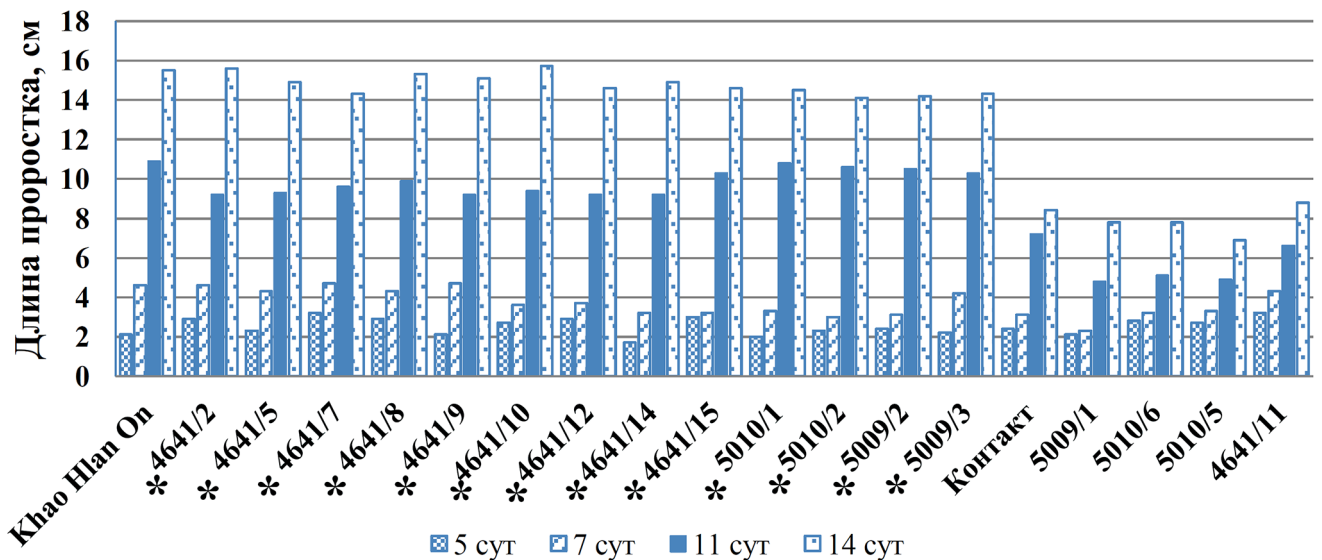
На 5-е сутки затопления, существенной разницы по длине coleoptile практически не наблюдалось, варьирование составило от 1,7 см (4641/14) до 3,2 см (4641/7 и 4641/11). На 7-е сут длина проростков увеличилась в донорном сорте Khao Hlan On на 2,5 см, в реципиентном сорте Контакт – на 0,7 см, а в линиях – от 0,2 см (4641/1 и 4641/15) до 2,6 см (4641/9). На 11-е сут максимальные значения по длине coleoptile наблюдались у линий 4641/15, 5010/1, 5010/2, 5009/2, 5009/3, а также у донорного сорта Khao Hlan On и составили 10,3 см, 10,8 см, 10,6 см, 10,5 см, 10,3 см и 10,9 см соответственно. На 14-е сутки разница по длине у линий риса без генов *AG1*, *AG2* и с генами была существенной и составила в среднем 6,9 см. Длина проростка растений риса, не имеющих гены *AG1* и *AG2*, была сходной с этим показателем у реципиентного сорт Контакт. Разница по длине проростка у линий с двумя генами и одним в среднем составила 0,7 см. Значение коэффициента вариации по признаку динамики роста варьировало от 17,3% (на 5-е сут) до 24,5% (на 14-е сут) (табл. 2).

Полученный неоднородный селекционный материал обладает наибольшим потенциалом для дальнейшего отбора лучших генотипов.

Таблица 2

Показатели динамики роста дигапloidных линий риса

Показатели	День проращивания, сут			
	5	7	11	14
Среднее значение длины проростка, см	2,5	3,7	8,8	13,1
Коэффициент вариации, %	17,3	19,2	23,1	24,5



Стандартное отклонение: на 5 сут – 0,4; на 7 сут – 0,7; на 11 сут – 2,0; на 14 сут – 3,2 см

Рис. 3. Динамика роста дигапloidных линий риса в условиях водного стресса
Примечание: * – линии, статистически значительно отличающиеся от отечественного сорта Контакт

Обсуждение

При прорастании семян риса под водой в корневой зоне возникает несколько неблагоприятных условий. Кислорода становится недостаточно, что препятствует дыханию и росту корней, а также накапливаются такие газы, как CO_2 и этилен. Недостаток кислорода приводит к замедлению роста и функционирования корней, тем самым снижая поглощение питательных веществ и воды. Кроме того, в токсичных концентрациях накапливаются некоторые вещества, такие как сероводород и промежуточные продукты анаэробного углеводного обмена — например, органические кислоты. Это изменяет рН среды и влияет на доступность питательных веществ для растения и их усвоение. В совокупности эти изменения приводят к повреждению корней и всего растения и в тяжелых случаях могут привести к его гибели [17]. Было обнаружено некоторое генетическое разнообразие в отношении устойчивости к переувлажнению, но оно не было в достаточной мере использовано в селекции.

Создание сортов риса, более устойчивых к затоплению во время прорастания, способствовало проведению исследований для выявления признаков, связанных с устойчивостью, и выведения селекционных линий, более подходящих для прямого посева. Недавно были идентифицированы основные QTL, *AG1* и *AG2*, связанные с устойчивостью к затоплению во время прорастания, и они являются целью для клонирования и использования в маркер-ориентированной селекции [2].

Когда затопление происходит сразу после прямого посева, устойчивые к слою воды генотипы риса прорастают лучше, а их проростки растут относительно быстрее, чтобы выбраться из затопленной почвы. Эти генотипы способны формировать корни и листья под водой. Их устойчивость к затоплению связана со способностью инициировать и поддерживать катаболизм углеводов в прорастающих семенах, анаэробное дыхание для поддержания энергоснабжения и сохранения растяжимости клеток растущего зародыша. По мере того, как проросток удлиняется и достигает более

аэрируемых зон, развивается аэренхима, обеспечивающая кислородом погруженные в воду части растения, особенно корни [17].

Образцы риса, которые мы выделили в результате исследований, представляют большую ценность для селекционной работы, направленной на создание сортов, устойчивых к глубокому уровню воды, который создается после посева семян. Эта технология позволяет подавить сорную растительность, которая не может преодолеть слой воды толщиной 30–40 см. Рис с генами *AG* способен к такому прорастанию, в результате чего сохраняется большое количество всходов, формируется оптимальная густота посева, а массив растений риса становится чистым от сорняков без применения гербицидов. Поэтому проведенные исследования имеют не только теоретическую, но и практическую пользу для сельского хозяйства.

Заключение

В ходе исследования провели скрининг дигиплоидных андрогенных растений риса на наличие генов энергии прорастания *AG1* и *AG2*. Ген *AG1* был идентифицирован в 17 линиях и в донорных сортах Inbara-3 и Khao Hlan On, а ген *AG2* — в 11 линиях, 9 из них унаследовали оба гена (4641/1, 4641/2, 4641/3, 4641/4, 4641/6, 4641/8, 4641/9, 4641/10, 5010/4). Лабораторный опыт по проращиванию зерен риса в пробирках выявил линии с высокой энергией прорастания. Значение коэффициента вариации по признаку динамики роста варьировало от 17,3% (на 5-е сут) до 24,5% (на 14-е сут). Семенной материал с перспективных андрогенных растений рекомендуется к внедрению в селекционные программы и представляет особый интерес для дальнейших исследований.

Исследование выполнено в рамках Государственных заданий № 0505-2025-0007 и №0505-2025-0009 ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской». Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim S.-M., Kim C.-S., Jeong J.-U., Reinke R.-F., Jeong J.-M. Marker-assisted breeding for improvement of anaerobic germination in japonica rice (*Oryza sativa*). *Plant Breed.* 2019;138(6):810–819.
2. Septiningsih E.-M., Ignacio J.-C.-I., Sendon P.-M.-D., Sanchez D.-L., Ismail A.-M., Mackill D.-J. QTL mapping and confirmation for tolerance of anaerobic conditions during germination derived from the rice landrace Ma-Zhan Red. *Theor. Appl. Genet.* 2013;126(5):1357–1366.
3. Oe S., Sasayama D., Luo Q., Fukayama H., Hatana-ka T., Azuma T. Growth responses of seedlings under complete submergence in rice cultivars carrying both the submergence-tolerance gene Sub1A-1 and the floating genes Snorkels. *Plant Prod. Sci.* 2021;25(1):70–77.
4. Mondal S., Hasan M.J., Ahmad T., Miah M.G., Cruz P.C.S., Ismail A.M. Effects of *AG1* and *AG2* QTLs on nonstructural carbohydrate and seed management options for rice seedling growth and establishment under flooding stress. *Rice Science.* 2020;27(6):515–528.
5. Bailey-Serres J., Chang R. Sensing and signaling in response to oxygen deprivation plants and other organisms. *Ann. Bot.* 2005;96(4):507–518.
6. Ismail A.-M., Ella E.-S., Vergara G.-V., Mackill D.-J. Mechanisms associated with tolerance to flooding during

germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). *Ann. Bot.* 2008;103(2):197–209.

7. Ismail A.-M., Johnson D.-E., Ella E.-S., Vergara G.-V., Baltazar A.-M. Adaptation to flooding during emergence and seedling growth in rice and weeds, and implications for crop establishment. *AoB Plants*. 2012;pls019.

8. Mackill D., Khush G. IR64: a high-quality and high-yielding mega variety. *Plant Science*. 2018;11(1):18.

9. Angaji S.-A., Septiningsih E.-M., Mackill D.-J., Ismail A.-M. QTLs Associated with tolerance of flooding during germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 2010;172(2):159–168.

10. Haque Md. A., Rafii M.-Y., Yusoff M.-M., Ali N.-S., Yusuff O., Arolo F., Anisuzzaman M. Flooding tolerance in Rice: adaptive mechanism and marker-assisted selection breeding approaches. *Mol. Biol. Rep.* 2023;50(3):2795–2812.

11. Baltazar M.-D., Ignacio J.-C.-I., Thomson M.-J., Ismail A.-M., Mendiore M.-S., Septiningsih E.-M. QTL mapping for tolerance of anaerobic germination from IR64 and the *aus* landrace Nanhi using SNP genotyping. *Euphytica*. 2014;197:251–260.

12. Чертова Н.Г., Усатов А.В., Костылев П.И., Дуплий Н.Г. Идентификация генов устойчивости к длительному затоплению в гибридных образцах риса. *Социально-экологические технологии*. 2023;13(4):366–383.

13. Kostylev P., Kalinina N., Vozzhova N., Golubova V., Chertkova N. Creation of rice doubled haploids resistant to prolonged flooding using anther culture. *Plants*. 2023;12(21):3681.

14. Manangkil O.-E., Vu H.-T.-T., Yoshida S., Mori N., Nakamura C. A simple, rapid and reliable bioassay for evaluating seedling vigor under submergence in indica and japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 2008;163:267–274.

15. Костылев П.И., Голубова В.А., Вожжова Н.Н., Калинина Н.В. Новый метод защиты риса от сорных растений с помощью длительного погружения в воду. *Биосфера*. 2022;14(4):343–346.

16. Sabouri H., Rezai A.-M., Moumeni A., Kavousi A., Katouzi M., Sabouri A. QTLs mapping of physiological traits related to salt tolerance in young rice. *Biol. Plant*. 2009;53:657–662.

17. Kirk G.-J.-D., Greenway B.-J., Atwell B.-J., Ismail A.-M., Colmer T.-D. Adaptation of rice to flooded soils. *Progress in Botani*. Eds. U. Lüttge, W. Beyschlag and J. Cushman. Berlin, Heidelberg: Progress in Botany; 2013:215–253.

Поступила в редакцию 27.09.2024

После доработки 23.05.2025

Принята в печать 11.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Identification of *AG* germination energy genes in dihaploid androgenic rice plants

N.G. Chertkova^{1,2,*} , P.I. Kostylev² , A.V. Usatov¹ , N.V. Kalinina¹ 

¹ Southern Federal University, Stachki Ave. 194, Rostov-on-Don, 344090, Russia;

² Federal State Budgetary Scientific Institution "Agrarian Research Center "Donskoy",
st. Scientific town, 3, Zernograd, 347740, Rostov region, Russia

*e-mail: tycik17082012@gmail.com

Rice plays a huge role in the nutrition of the world population. In Russia, as in Europe and America, rice is mainly sown by direct seeding, while in Asian countries, seedling technology is used. Direct seeding is followed by flooding of the field, which can lead to a low percentage of seedlings and death of young plants. On the other hand, flooding of rice fields helps in the fight against weeds and rodents. Despite the fact that rice is a hydrophyte plant, water can lead to hypoxia or even anoxia, contributing to the suppression of young shoots. In general, most rice varieties at the early stages of development under water stress have low survival, so it is necessary to screen 8 genotypes and select breeding material capable of withstanding stressful conditions. One of the factors of tolerance to water stress conditions is the germination energy *AG* (anaerobic germination), which is a complex trait controlled by several genes mapped on different chromosomes. Foreign scientists have identified varieties with the *AG* germination energy genes (Khao Hlan On, Mazhan Red and others). In our country, there are currently few varieties with genes for resistance to anaerobic conditions. Currently, a small number of local varieties and populations have been studied for tolerance to anaerobic conditions using QTL, so it is necessary to expand the study of a large number of samples to select resistant genotypes. Therefore, the purpose of the study was to screen dihaploid androgenic rice plants for the presence of *AG1*, *AG2* germination energy genes and to select promising genotypes of particular interest for breeding work. The source material was 25 regenerated plants obtained by *in vitro* anther culture from four hybrids whose parental lines were donors of germination energy (Khao Hlan On), resistance to deep-water flooding (Inbara-3, IR-64) and Russian varieties (Contact, Magnat, Novator). Molecular genetic analysis was performed using molecular markers *AG1* (qAG-9-2) and *AG2* (qAG-7-1). In total, the *AG1* gene was identified in 17 rice lines, the *AG2* gene in 11 lines, and both genes in 9 rice lines (4641/1, 4641/2, 4641/3, 4641/4, 4641/6, 4641/8,

4641/9, 4641/10, 5010/4). Laboratory experiment on dihaploid lines resistance to anaerobic stress revealed samples with high germination energy. Promising dihaploid androgenic rice plants were selected as source material for breeding.

Keywords: *rice, in vitro method, anaerobic germination, AG1 and AG2 genes, dihaploid androgenic rice plants, anaerobic stress*

Funding: The study was carried out within the framework of State assignments No. 0505-2025-0007 and No. 0505-2025-0009 of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Donskoy Agrarian Scientific Center”.

Сведения об авторах

Черткова Наталья Григорьевна — аспирантка кафедры генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ; мл. науч. сотр. лаборатории клеточной селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской». Тел.: 8-86359-4-14-68; e-mail: tycik17082012@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4005-9771>

Костылев Павел Иванович — докт. с.-х. наук, проф., гл. науч. сотр. лаборатории селекции и семеноводства риса, руководитель Центра фундаментальных научных исследований ФГБНУ «АНЦ «Донской». Тел.: 8-86359-4-14-68; e-mail: p-kostylev@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4371-6848>

Усатов Александр Вячеславович — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией молекулярной генетики Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ЮФУ. Тел.: 8-863-243-31-76; e-mail: usatova@sfedu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0600-7927>

Калинина Наталия Владимировна — науч. сотр. лаборатории клеточной селекции ФГБНУ «АНЦ «Донской». Тел.: 8-86359-4-14-68; e-mail: kalinina74783@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2305-4189>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК (591.111+577.151+591.2/.5):262.5

Экто-АТФазы, морфометрия и теплопродукционная активность эритроцитов хрящевых и костистых черноморских рыб

Ю.А. Силкин¹ , М.Ю. Силкин¹ , Е.Н. Силкина¹ , С.О. Омельченко²

¹ Карадагская научная станция имени Т.И. Вяземского — природный заповедник Российской академии наук — филиал Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», Российская академия наук, Россия, 298188, г. Феодосия, пос. Курортное, ул. Науки, д. 24;

² Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского, Россия, 295007, г. Симферополь, просп. Вернадского, д. 4

*e-mail: ysilkin@mail.ru

Изучены активность экто-АТФазы и размерные характеристики эритроцитов у двух видов хрящевых и десяти видов костных рыб, а также теплопродукционная активность суспензии эритроцитов у *Scorpaena porcus* и *Raja clavata*. Показано, что активность экто-АТФазы красных клеток крови (red blood cells — RBC) между хрящевыми рыбами различается в 1,5 раза и составляет у *Raja clavata* 3,1 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, а у *Dasyatis pastinaca* — 2,1 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC. Для эритроцитов костистых рыб характерна более значительная изменчивость активности экто-АТФазы, которая между своими крайними значениями различалась более, чем в 60 раз (у *Scorpaena porcus* она составила 6,4 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, у *Spicara flexuosa* и некоторых других видов — 0,1 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC). При сравнении размерных характеристик эритроцитов и величин активности экто-АТФазы была показана прямая связь между этими показателями. Исследование теплопродукции суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены показало, что при добавлении АТФ к суспензии выделенных клеток (1 мг/мл) происходит значительное увеличение температуры в экспериментальной ячейке. Эритроциты морской лисицы и скорпены демонстрировали разную динамику генерации тепла. Так ΔT , генерируемая эритроцитами скатов, была почти в два раза ниже, чем в эритроцитах скорпены. Общая продолжительность процесса генерации тепла до максимума ΔT в суспензии эритроцитов морской лисицы была почти в четыре раза короче, чем у скорпены. Однако процесс понижения температуры в суспензии эритроцитов скорпены происходил в два с лишним раза медленнее, чем у морской лисицы. Полученные результаты показали, что экто-АТФазы эритроцитов рыб, по-видимому, несут функцию источника локальной генерации тепла на поверхности эритроцита и, тем самым, могут быть глубоко интегрированы в функционирование мембраны клетки и всего кровотока в целом.

Ключевые слова: рыбы, температура, эритроциты, цитоморфометрия, АТФ, теплопродукция, экто-АТФаза

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-2-8

Введение

Экто-АТФаза, открытая Венкстерн и Энгельгардтом [1, 2] на ядерных эритроцитах ряда холонокровных (аксолотль, лягушка, черепахи) и теплокровных (голубь) организмах в середине прошлого столетия, является ферментом, функциональное назначение которого до настоящего времени полностью не выяснено. Активность фермента в ядерных эритроцитах позвоночных варьирует в широких пределах, и, по данным Бенкика, Ятеса и Ингерманна [3], этот диапазон может составлять

между самыми низкими и высокими показателями активности шесть порядков. Особенно высокая активность энзима показана в крупных, по линейным размерам, ядерных красных клетках крови (Red Blood Cells — RBC) земноводных, «рекордсменом» среди которых является активность фермента в эритроцитах тритона (*Taricha rivularis* ~ 192,0 ± 107,5 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC) и длиннопалой саламандры (*Ambystoma macrodactylum* ~ 107,5 ± 45,4 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC). Эти исследования продемонстрировали взаимосвязь раз-

мерных характеристик ядерных эритроцитов и высоких показателей активности их экто-АТФаз. Эти же исследования также показали достаточно большой диапазон вариабельности активности экто-АТФазы эритроцитов у пресноводных костистых рыб Северной Америки. Пересчет представленных данных в удобные для сравнения единицы активности показал, что активность фермента у серебряного караса (*Carassius auratus*) составляет $\sim 0,17$ нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, у канального сомика (*Ictalurus punctatus*) $\sim 0,03$ нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, у солнечного синежаберного окуня (*Lepomis macrochirus*) $\sim 0,013$ нмоль Φ_n /мин/мкл RBC, а у большегубого чукчуна (*Catostomus macrocheilus*) $\sim 0,005$ моль Φ_n /мин/мкл RBC [3]. Как видно из представленных значений, разброс активности экто-фермента в эритроцитах пресноводных рыб был довольно значителен (в 5–34 раза).

Исследований о взаимосвязи размерных характеристик эритроцитов и активности экто-АТФаз у морских видов рыб в доступной научной литературе нами не найдено. Также функциональное назначение экто-АТФазы эритроцитов позвоночных, в том числе пресноводных и морских рыб, до настоящего времени до конца не установлено.

Хорошо известно, что экто-АТФазы эритроцитов позвоночных осуществляют гидролиз АТФ в окооклеточном пространстве [3]. До недавнего времени считалось, что концентрация АТФ в плазме крови позвоночных близка к нулю и ее выход из эритроцитов теплокровных во внеклеточное пространство в наномолекулярных количествах обусловлено функцией пуриnergической сигнализации, направленной на регуляцию капиллярного кровотока [4]. Однако совсем недавно было установлено присутствие в плазме радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) значительного количества АТФ. Наличие микромолярных концентраций (не менее $3 \mu\text{M}$) АТФ в плазме крови рыб постоянно поддерживается за счет выделения макроэрга эритроцитами. Предполагается, что этот процесс и, соответственно, концентрация АТФ увеличивается с ростом деформационных нагрузок крупных эритроцитов рыб в капиллярном отделе кровотока [5]. Однако причины высокого уровня внеклеточного АТФ в кровотоке рыб точно не установлены, и эта проблематика открыта для более детального исследования. Как уже было сказано, АТФ в плазме крови постоянно подвергается ферментативному, тепловому гидролизу — в основном, за счет внеклеточных АТФаз эритроцитов, эндотелиальных клеток сосудов, и еще других, неустановленных, «участников» этого процесса.

Целью данного исследования было изучение активности экто-АТФазы, размеров эритроцитов и их теплопродукционной активности у некоторых хрящевых и костистых черноморских рыб.

Материалы и методы

Объекты исследования. Эксперименты проведены на эритроцитах двух видов хрящевых и десяти видов костистых черноморских рыб. Хрящевые рыбы: морская лисица (*Raja clavata* Linnaeus, 1758) и морской кот, хвостокол (*Dasyatis pastinaca* Linnaeus, 1758). Костистые виды рыб: скорпена (морской ерш) (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758); звездочет (морская корова) (*Uranoscopus scaber* Linnaeus, 1758); рулена (*Symphodus tinca* Linnaeus, 1758); ласкирь (*Diplodus annularis* Linnaeus, 1758); бычок-кругляк (*Gobius melanostopus* Pallas, 1814); смарида (*Spicara flexuosa* Ranesque, 1810); ставрида (*Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev); налим (*Gaidropsarus mediterraneus* Linnaeus, 1758), черноморский калкан (*Scophthalmus maeoticus*, Pallas, 1814), морской петух (*Chelidonichthys lucerne* Linnaeus, 1758).

Рыб отлавливали в районе восточного побережья Крымского полуострова — горного массива Карадаг — с помощью ставного невода и доставляли в лабораторию в пластиковых баках с принудительной аэрацией. Транспортировка длилась 30–40 мин. После отлова хрящевых рыб (скаты) рассаживали в бассейны объемом 1000 л, костистых рыб — в аквариумы емкостью до 300 л. В бассейнах и аквариумах осуществлялась принудительная аэрация и поддерживалась температура $+10$ – 12°C для холодолюбивых и $+14$ – 17°C для теплолюбивых рыб. Акклимация рыб после отлова длилась в течение 2–4 сут без кормления, после чего рыб брали в опыт.

Получение эритроцитов. Забор крови у хрящевых рыб осуществляли путем пункции желудочка сердца инъекционной иглой, от одной особи можно было получить до 10 мл крови. Такого количества крови от одного ската хватало для проведения серии опытов. У костистых рыб кровь получали путем пункции хвостовой вены: от одной костистой рыбы можно было получить от 0,5 до 1 мл крови, поэтому для проведения опытов кровь отбирали от пяти или семи особей. Все исследования проводили в день забора крови, если эксперименты не требовали большего времени. Полученную кровь переносили в охлажденный физиологический раствор для отмывания эритроцитов от плазмы в соотношении 1:10. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (50 ед/мл крови) (Спофа, Чехия). Эритроциты отмывали от плазмы дважды, после чего центрифугировали при 1500 об./мин, в течение 5 мин на центрифуге К-23 (Janetzki, Германия) в десятикратном объеме изотонического раствора следующего состава (в ммоль/л): для хрящевых рыб — 220 NaCl, 400 мочевины, 10 Трис-HCl-буфера, (pH 7,3–7,4); для костистых рыб — 180 NaCl, 10 Трис-HCl-буфера, (pH 7,3–7,4). После центрифугирования эритроциты отделяли от лейкоцитов и плазмы.

Гематокрит суспензий эритроцитов определяли с помощью гематокритной центрифуги ТН-11 (Janetzki, Германия).

Морфометрия эритроцитов рыб. Сразу после взятия крови у рыб готовили мазки, которые после необходимых процедур окрашивали красителем по Романовскому-Гимза [6]. Оптические исследования мазков проводили на бинокулярном микроскопе STUDAR ЕК PZO (Польша) с использованием стандартных объективов PZO (Польша) 40/0.65 (160/0.17), 100/1.3 ОI (160/0.17). Для получения снимков использовалась цифровая камера MC-6.3 USB 3.0 фирмы ЛОМО (Россия). На полученных фотографиях клеток определяли линейные размеры эритроцитов с помощью компьютерной программы ImageJ 1,44p [7]. Измеряли большой и малый диаметр клеток и площадь эритроцитов. Линейные значения размеров эритроцитов были получены на основании 100 промеров. Площадь эритроцитов рыб определяли по формуле:

$$\text{площадь эритроцитов } (S) = \pi \cdot \frac{LD}{2} \cdot \frac{SD}{2},$$

где S — площадь эритроцита (мкм^2); π — число пи; LD — большая ось клетки; SD — малая ось клетки [8].

Определение активности экто-АТФазы эритроцитов рыб. Для определения активности экто-АТФазы в цельных эритроцитах и препаратах мембран использовали методику Казеннова с соавт. [9]. Инкубационная среда для определения активности экто-АТФазы эритроцитов ската содержала в конечной концентрации (мМ) следующие ингредиенты: 400 — мочевины, 135 — NaCl , 5 — KCl , 6 — MgCl_2 , 1 — ЭДТА, 50 — Трис- HCl , $\text{pH} = 7,4$; для эритроцитов костистых рыб: 125 — NaCl , 5 — KCl , 6 — MgCl_2 , 1 — ЭДТА, 50 — Трис- HCl , $\text{pH} = 7,4$. В инкубационных пробирках смешивали 0,1 мл инкубационной среды, 0,1 мл H_2O , 0,1 мл 2,0 мМ раствора АТФ- Na_2 . Реакцию запускали добавлением 0,1 мл суспензии эритроцитов. Температура инкубации в стандартных условиях составляла $+20^\circ\text{C}$. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об./мин. В надосадочной жидкости по модифицированному Казенновым и Масловой [10] методу Чена с соавт. [11] было определено содержание неорганического фосфата (Φ_n), по накоплению которого судили об активности фермента. Согласно такой модификации методики, при определении содержания Φ_n в пробе, в качестве восстановителя фосфорномолибденовой кислоты, помимо аскорбиновой кислоты, использовали хлористое олово (SnCl_2). К 0,9 мл H_2O приливали 0,1 мл супернатанта, смешивали с 0,8 мл реактива «А» [$10 \text{ NH}_4\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + 5\% \text{ раствор } (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в соотношении 1:2:1], через 1–2 мин при непрерывном помешивании прибавляли 0,2 мл реактива «В» (25 мг аскорбиновой кислоты растворяли в 12 мл H_2O , в который добавляли 0,1 мл 24%-ного раствора SnCl_2 в концентрированной HCl). Через 15 мин инкубации при комнатной температуре интенсивность развившейся окраски молибденового синего оценивали на спектрофотометре Specol 11 (Carl Zeiss, Германия) по поглощению света при длине волны в 720 нм. Калибровочный график показал прямолинейную зависимость экстинкции при содержании в пробе от 10 до 100 нмоль Φ_n . Активность экто-АТФазы рыб выражали в нмоль Φ_n /мин/мкл RBC.

Изучение теплопродукции суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены. Исследования проводили в модифицированном для этих целей макрокалориметре [12]. Объемы суспензий в экспериментальной ячейке (Т1) эритроцитов исследованных рыб были разными ввиду сложности получения достаточного количества эритроцитов. Для ската конечный объем суспензии составлял 5,0 мл (4,5 мл суспензии клеток + 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 5 мг АТФ), а для скорпены — 2,0 мл (1,5 мл суспензии клеток + 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 2 мг АТФ). Конечная концентрация АТФ в экспериментальных ячейках составляла 1 мг/мл суспензии. Параллельно готовили такую же контрольную ячейку (Т2) с соответствующим определенному виду рыб физиологическим раствором. Эксперименты проводили при комнатной температуре ($+20^\circ\text{C}$). Ячейки, в которых проводились исследования (Т1 и Т2), представляли собой пластиковые пробирки с внешней термоизоляцией емкостью 10,5 мл с крышкой из материала с малой теплопроводностью. Внесение 0,5 мл термостатированной аликвоты АТФ проводилось непосредственно в ячейку с суспензией эритроцитов с помощью микродозатора. В измерительные ячейки также помещались платиновые резистивные термодатчики HEL700-102BAA-B00. Резистивные термодатчики фирмы Honeywell (США) с сопротивлением в 1 кОм являются миниатюрными, квадратной формы с размерами 1,5–2,0 мм и толщиной 0,1 мм платиновыми сенсорами. Они позволяют производить измерение температуры в установке с точностью до $\pm 0,0001^\circ\text{C}$ при частоте измерений в 0,16 Гц и с точностью до $\pm 0,0015^\circ\text{C}$ при максимальной частоте измерений в 6,65 Гц. Особенностью дифференциального метода является использование двух ячеек — контрольной (Т2) и измерительной (Т1), находящихся в макрокалориметре, для исключения внешнего и внутреннего теплообмена. В работе использовали измерение $\Delta T = T1 - T2$, которое представляло разность температуры в измерительной (Т1) и контрольной (Т2) ячейках, что исключало артефакты внешних тепловых воздействий и повышало надежность получаемых

данных. Сигналы от датчиков с дискретностью 6,65 измерений в секунду при помощи специального электронного блока и разработанной программы конвертировались в компьютер. В конечном виде эти измерения обрабатывались при помощи специального программного обеспечения и записывались в виде массива данных. На экране монитора программа выводила график, который позволял проводить оперативную оценку текущих изменений температуры внутри ячейки. Скорость изменения температуры в ячейке выражали в °С/ч. Полученные экспериментальные данные обрабатывались с помощью программы OriginPro фирмы OriginLabCorp.

Объем материала. Число выполненных опытов – 1756: из них по определению активности фермента – 146, по определению теплопродукции эритроцитов – 12, по морфологии эритроцитов – 1200. Данные подвергали статистической обработке и представляли как среднее арифметическое ± стандартное отклонение ($\bar{x} \pm S'\bar{x}$). Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента (t) при уровне значимости $p < 0,05$. Для определения нормальности распределения сравниваемых групп использовали критерий Колмогорова-Смирнова, корреляцию между выборками рассчитывали в модуле Statistics программы OriginPro (США).

Результаты исследования

Изучение цитоморфометрических характеристик и активности экто-АТФазы эритроцитов рыб. Полученные результаты по линейным размерам эритроцитов и величинам активности экто-АТФазы в них у исследованных рыб представлены в таблице.

По своим размерным характеристикам эритроциты скатов оказались самыми крупными клетками (*Raja clavata* – $26,8 \times 14,0$ мкм; *Dasyatis pastinaca* – $23,9 \times 15,5$ мкм) среди эритроцитов исследованных рыб. По площади клеток эритроциты *Raja clavata* и *Dasyatis pastinaca* также характеризовались близкими значениями ($294,5 \pm 9,4$ и $290,8 \pm 7,8$ мкм² соответственно) и значительно превосходили показатели самых крупных эритроцитов исследованных костистых рыб. Среди костистых рыб самые большие клетки были у *Scorpaena porcus*. Крупные эритроциты были также отмечены у *Uranoscopus scaber* и у *Symphodus tinca* (таблица). У пяти исследованных видов (в порядке следования в таблице от *Diplodus annularis* до *Spicara flexuosa*) размеры эритроцитов были достаточно близкими. Величины их площадей колебались от 50 до 62,3 мкм². Самыми мелкими среди исследованных видов рыб оказались эритроциты *Trachurus mediterraneus ponticus* и *Gaidropsarus*

Таблица

Размерные характеристики эритроцитов и активность экто-АТФазы в них у морских рыб

Виды рыб	Размеры эритроцитов (мкм)		Площадь эритроцитов (S _{мкм} ²)	Активность экто-АТФазы (нмоль Ф _n /мин/мкл RBC)
	Большая ось (LD)	Малая ось (SD)		
Хрящевые				
<i>Raja clavata</i>	26,8 ± 1,6	14,0 ± 0,9	294,5 ± 9,4	3,1 ± 0,1 (25)
<i>Dasyatis pastinaca</i>	23,9 ± 1,8	15,5 ± 1,3	290,8 ± 7,8	2,1 ± 0,1 (17)
Костистые				
<i>Scorpaena porcus</i>	14,4 ± 0,3	8,7 ± 0,1	98,3 ± 8,8	6,4 ± 0,2 (38)
<i>Uranoscopus scaber</i>	12,7 ± 1,1	8,3 ± 0,7	82,7 ± 9,3	4,2 ± 1,3 (7)
<i>Symphodus tinca</i>	11,5 ± 0,8	7,8 ± 0,6	70,4 ± 10,3	1,2 ± 0,3 (5)
<i>Diplodus annularis</i>	10,9 ± 0,4	7,3 ± 0,1	62,5 ± 5,6	0,36 ± 0,05 (7)
<i>Gobius melanostopus</i>	10,1 ± 0,9	7,6 ± 0,7	57,9 ± 6,3	0,11 ± 0,01 (5)
<i>Chelidonichthys lucerne</i>	9,8 ± 0,4	6,9 ± 0,1	53,1 ± 7,0	0,2 ± 0,01 (5)
<i>Scophthalmus maeoticus</i>	9,3 ± 0,2	7,2 ± 0,2	52,6 ± 8,6	0,3 ± 0,03 (5)
<i>Spicara flexuosa</i>	9,5 ± 0,1	6,7 ± 0,1	50,0 ± 4,9	0,1 ± 0,01 (6)
<i>Trachurus mediterraneus ponticus</i>	7,8 ± 0,4	5,0 ± 0,3	30,6 ± 2,6	0,12 ± 0,02 (21)
<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>	6,5 ± 0,3	4,1 ± 0,2	20,9 ± 1,8	0,1 ± 0,02 (5)

Примечание: данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; число в скобках – количество повторов; цифры в скобках – количество повторных опытов. Коэффициент корреляции (r) между площадью эритроцитов и активностью экто-АТФазы у костистых рыб: 0,8261 ± 0,2301 (p < 0,05).

mediterraneus. Линейные размеры их клеток составляли всего $7,8 \times 5,0$ и $6,5 \times 4,1$ мкм (таблица), а площадь, соответственно, 30,6 и 21 мкм². Эритроциты *Scorpaena porcus* по площади в три раза уступали по этому показателю эритроцитам скатов. Площадь эритроцитов *Trachurus mediterraneus ponticus* была меньше площади эритроцитов скатов почти в 10 раз, а *Gaidropsarus mediterraneus* — в 15 раз (таблица).

Экто-АТФаза эритроцитов *Raja clavata* и *Dasyatis pastinaca* демонстрировала достаточно близкие значения своей активности ($3,1 \pm 0,1$; $2,1 \pm 0,1$ соответственно) различие которых между скатами составляло всего около 30% (таблица).

Активность экто-АТФазы эритроцитов среди исследованных костистых рыб характеризовалась значительной вариабельностью в способности расщеплять АТФ. Между высокими и низкими значениями активности фермента эритроцитов костистых рыб различия превышали 60-кратную величину (таблица). Самой высокой активностью экто-АТФазы обладали эритроциты *Scorpaena porcus* и *Uranoscopus scaber*. Относительно высокая активность фермента также была отмечена у *Symphodus tinca*. У остальных костистых рыб активность фермента была относительно низкой и колебалась от 0,1 до 0,36 нмоль Φ_n /мин/мкл RBC (таблица). Корреляционный анализ между совокупностью значений площади эритроцитов костистых рыб и активностью экто-АТФазы в них показал достоверную прямую взаимосвязь (коэффициент корреляции был равен $0,8261 \pm 0,2301$,

при $p < 0,05$) между величиной площади клеток и активностью их фермента.

Изучение теплопродукции суспензий эритроцитов морской лисицы. Теплограмма суспензии эритроцитов (объемом в 5 мл) морской лисицы после добавления АТФ (1 мг/мл) представлена на рис. 1.

Из представленной теплограммы видно, что начальный этап эксперимента в ячейках характеризовался отсутствием значимых изменений ΔT , что свидетельствовало о стабилизации температуры как в экспериментальной (Т1), так и в контрольной (Т2) ячейках. Момент добавления в суспензию эритроцитов ската АТФ демонстрирует линия резкого падения температуры в ячейке на $0,08^\circ\text{C}$. Это было связано с реакцией термодатчика на струйное добавление раствора с макроэргическим субстратом. В течение $0,075$ ч после этого наблюдали быстрое нарастание температуры в ячейке, максимум которой превышал исходный уровень на $0,082^\circ\text{C}$. Скорость этого процесса была достаточно высокой и в начальный момент составляла $9,2^\circ\text{C}/\text{ч}$, затем в течение 9–10 мин она постепенно снижалась до $2,6^\circ\text{C}/\text{ч}$ и к моменту температурного максимума составляла $0,4^\circ\text{C}/\text{ч}$ (рис. 1). После этого наблюдали постепенное снижение температуры к исходному, нулевому, значению ΔT , которое было достигнуто после $0,65$ -часового интервала с момента добавления АТФ. Общий перепад температуры в процессе эксперимента, с учетом падения температуры в момент добавления раствора АТФ, составил $0,1619^\circ\text{C}$ (рис. 1).

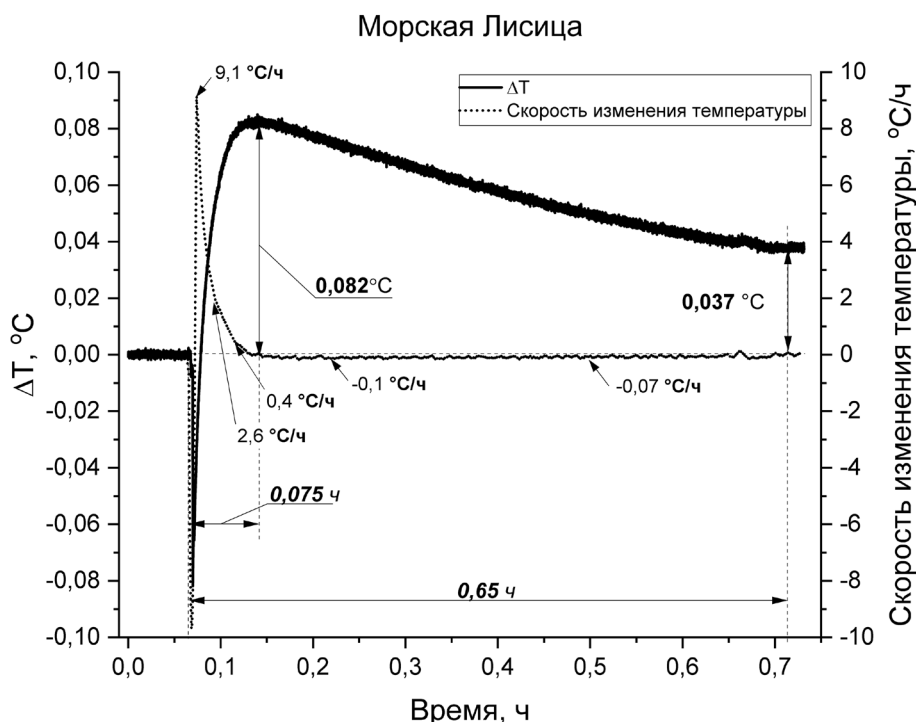


Рис. 1. Изменение температуры в суспензии эритроцитов морской лисицы при добавлении АТФ.

Примечание: $\Delta T^\circ\text{C} = T1 - T2$, разность температуры в измерительной (Т1) и контрольной (Т2) ячейках; цифры вдоль кривой — скорость процесса в $^\circ\text{C}/\text{ч}$.

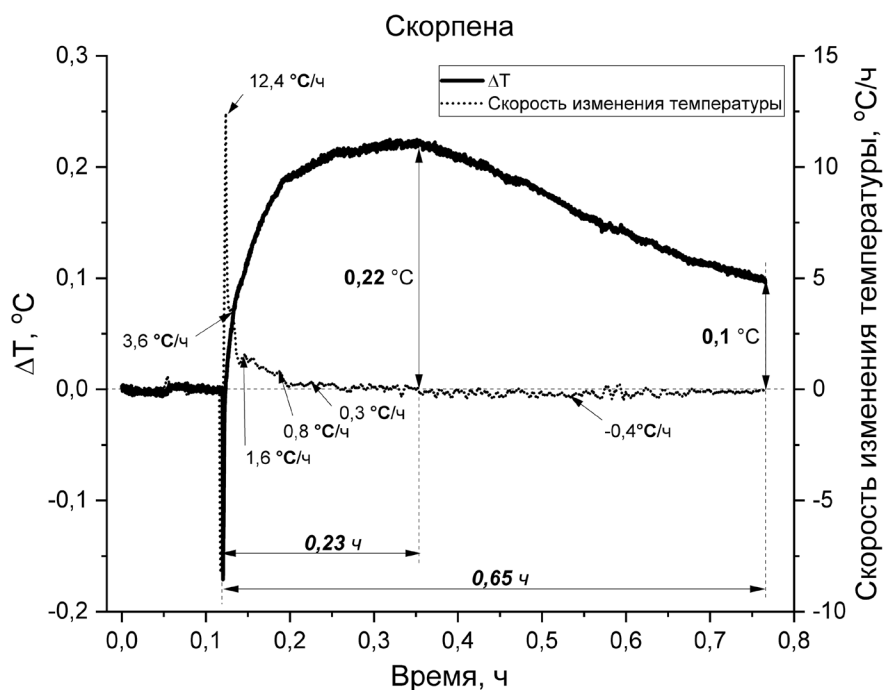


Рис. 2. Изменение температуры в суспензии эритроцитов скорпены при добавлении АТФ.

Примечание: $\Delta T^{\circ}\text{C} = T_1 - T_2$, разность температуры в измерительной (T_1) и контрольной (T_2) ячейках; цифры вдоль кривой — скорость процесса в $^{\circ}\text{C}/\text{ч}$.

Изучение теплопродукции суспензий эритроцитов скорпены. Теплограмма суспензии эритроцитов (объемом 2 мл) скорпены после добавления АТФ (1 мг/мл) представлена на рис. 2. Из рисунка видно, что опыт с суспензией эритроцитов скорпены демонстрирует несколько иную динамику прироста температуры в ячейке после добавления АТФ. Как и в предыдущем опыте, температура исходного раствора АТФ немного не совпадала с температурой суспензии клеток в ячейке T_1 , поэтому разность температур (ΔT) в ячейке T_1 в этот момент несколько снизилась на $0,1889^{\circ}\text{C}$ относительно температуры в контрольной ячейке T_2 . Однако, несмотря на падение ΔT , процесс теплопродукции в суспензии эритроцитов скорпены оказался способен в течение $0,23$ ч не только компенсировать эту разницу, но и осуществить прирост ΔT на $0,22^{\circ}\text{C}$. Скорость прироста температуры в суспензии скорпены в начале процесса составляла $12,4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, затем постепенно снижалась до $3,6^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ и к достижению максимума составила $0,3$ – $0,4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Весь процесс увеличения температуры в эритроцитах скорпены занимал $0,23$ ч с момента добавления АТФ. Общий перепад температуры в суспензии клеток скорпены составлял $0,4089^{\circ}\text{C}$ (рис. 2).

Обсуждение результатов

Систематические исследования поверхностных АТФаз начались в середине 40-х гг. пионерскими работами Манна [13]. Манн обнаружил расщепление внеклеточной АТФ в суспензии

сперматозоидов, а Ротштейн и Мейер детально изучили и описали способность дрожжевых клеток расщеплять в окружающей среде фосфорные производные, в том числе и адениловые нуклеотиды. В последующие десятилетия число работ, связанных с изучением поверхностных нуклеотидаз, начинает быстро расти, а «география» встречаемости фермента(ов) среди доклеточных форм, животных и растительных клеток — стремительно расширяться [14]. Интерес к изучению этих ферментов — как ранее, так и в настоящее время — обусловлен широтой распространения, загадочностью их функционального назначения и высокими значениями удельной активности на поверхности некоторых клеток. Эритроциты позвоночных относятся к одним из первых клеток, на которых были открыты экто-АТФазы и показана их высокая активность [1, 2]. Авторы, ввиду высокой активности экто-фермента на поверхности эритроцитов позвоночных (голубь, лягушка, аксолотль, черепаха), выдвинули предположение о важной биологической роли этого энзима в функционировании клетки. Эти исследования долгое время не имели продолжения до того момента, пока не было установлено, что экто-АТФазы безъядерных эритроцитов теплокровных принимают участие в качестве «выключателя» P_2 -рецепторов. Эти рецепторы обеспечивают активацию механизмов выделения закиси азота (NO), вызывающей расширение сосудов и увеличение притока O_2 в те ткани, которые в нем нуждаются. [4]. Однако установленная закономерность на эритроцитах теплокровных не была подтверж-

дена Йенсенем и соавторами [5] при поиске этого механизма на эритроцитах форели. Ключевым моментом в этих исследованиях явилось установление факта постоянного присутствия в крови радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) АТФ в высокой (~3 мМ) концентрации. Высокие фоновые значения АТФ в крови рыб свидетельствуют о том, что макроэргические фосфаты постоянно выделяются эритроцитами в плазму и играют другую роль в функционировании кровотока. Однако стимуляция дополнительного выделения АТФ за счет изменения насыщенности гемоглобина кислородом или увеличения в инкубационной среде содержания CO₂ не приводила к дополнительному выходу АТФ из эритроцитов форели. Это полностью противоречило тем экспериментам, когда эритроциты млекопитающих (хомяки, кролики, крысы, человек) при увеличении в плазме и клетках CO₂ и снижении насыщенности внутриклеточного гемоглобина кислородом высвобождали из эритроцитов АТФ, которая посредством активации P2-рецепторов эндотелия сосудов приводила к локальному расширению артериол и капилляров [15]. Авторы сделали вывод о том, что функциональное назначение экто-АТФазы ядерных эритроцитов может быть совсем иным, чем у безъядерных эритроцитов млекопитающих, и не связано с активацией сосудорасширяющих механизмов.

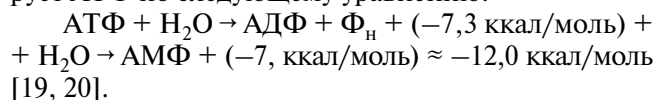
Самые крупные эритроциты скатов (морская лисица и морской кот) не обладают самой высокой активностью фермента и мы, по ряду причин, рассматриваем их отдельно от костистых рыб. Скаты — представители хрящевых рыб, которые эволюционно отличаются от костистых рыб. Эти рыбы имеют существенные различия по составу тканей, анатомии, физиологии и биохимии их функционирования. Эритроциты — не исключение из этого правила. Так, эритроциты скатов имеют необычайную толерантность к высоким концентрациям мочевины (~400 мМоль), что, видимо, является совершенно иным способом поддержания осмотического баланса с морской средой. Нами также установлено, что экто-АТФазы морской лисицы и скорпены относятся к разным подсемействам, которые по-разному чувствительны к действию азида натрия [16]. Как самые крупные клетки эритроциты скатов должны были бы демонстрировать самую высокую экто-АТФазную активность. Однако самую высокую активность фермента демонстрируют эритроциты скорпены (таблица). Скорее всего отсутствие строгой «стехиометрии» размеров клеток и активности фермента у скатов по сравнению с костистыми рыбами, видимо, обусловлено наличием еще каких-то важных факторов, которые еще предстоит установить.

В наших исследованиях прослеживается четкая корреляционная взаимосвязь между размерными характеристиками эритроцитов костистых

рыб и величиной их экто-АТФазной активности (таблица). У костистых рыб крупные эритроциты скорпены, звездочета, рулены демонстрировали высокую экто-АТФазную активность. С уменьшением размеров эритроцитов рыб от 10 мкм по LD и меньше 8 мкм — по SD и площади — менее 60 мкм² — активность фермента варьировала от 0,1 до 0,3 нмоль Ф_н/мин/мкл RBC, что было (за исключением *Carassius auratus*) на порядок и более выше, чем в эритроцитах пресноводных рыб [3]. Следует отметить, что представленные данные по активности экто-АТФазы эритроцитов рыб ограничены небольшой выборкой видов, хотя и на этом материале зависимость величины активности фермента прослеживается достаточно четко. Активность экто-АТФазы эритроцитов скорпены, обладающей среди исследованных морских видов рыб самой высокой активностью фермента, была в 16–30 раз ниже, чем активность энзима эритроцитов у бесхвостых амфибий (см. Введение) [15].

Размеры клеток тритона (*Taricha rivularis*) и длиннопалой саламандры (*Ambystoma macrodactylum*) составляют, соответственно, 41×26 мкм и 65×37 мкм [17, 18]. Значения активности экто-АТФазы у бесхвостых амфибий (*Taricha rivularis* ~ 192,0±107,5 нмоль Ф_н/мин/мкл RBC) и длиннопалой саламандры (*Ambystoma macrodactylum* ~ 107,5±45,4 нмоль Ф_н/мин/мкл RBC) вполне соответствуют нашим выводам о том, что размеры эритроцитов определяют порядок активности их экто-АТФаз [3].

Экто-АТФазы уникальны ввиду расположения на поверхности плазматической мембраны клетки их активного центра, ориентированного для выполнения гидролиза АТФ во внеклеточном пространстве, окружающем эритроцит. Однако экто-АТФазы в системе крови никогда не рассматривались в качестве фактора, влияющего на реологию кровотока. Присутствие микромолярных концентраций внеклеточной АТФ в примембранном пространстве эритроцита, должно носить характер постоянно действующего фактора. Во-первых, одной из функций экто-АТФаз может быть регуляция поддержания необходимых концентраций АТФ в сосудах. Во-вторых, ферментативная реакция экто-АТФазы является экзотермической ввиду того, что гидролиз АТФ не сопряжен с образованием какой-либо химической связи или с выполнением работы по переносу ионов и других субстратов. Экто-АТФаза катализирует АТФ по следующему уравнению:



На «побочный» эффект выделения тепла экто-АТФазами эритроцитов позвоночных в результате их ферментативной активности исследователи особого внимания не обращали. Однако необходи-

мость в использовании тепловой энергии актуальна для функционирования плазматических мембран как ядерных, так и безъядерных эритроцитов. Тепло в примембранной области клетки может иметь большое значение для изменения вязкоэластичных свойств плазматической мембраны при продвижении эритроцитов в капиллярах и в реологии кровотока в целом. Можно полагать, что для нормального функционирования самой мембраны и ее компонентов в клетке наличие внеклеточного пула АТФ является совершенно необходимым условием. В связи более «жесткого» состава поверхностного монослоя мембраны, может происходить подогрев этого монослоя за счет теплового гидролиза внеклеточной АТФ и выравнивание вязкоэластичных свойств мембраны в целом [21, 22]. Как мы полагаем, экто-АТФазы эритроцитов, кроме подогрева собственной мембраны совместно с экто-АТФазами эндотелия капилляров, могут оказывать тепловое воздействие на пристеночный слой плазмы и, тем самым, снижать вязкостные характеристики крови. Это может происходить за счет дополнительного выделения во внеклеточное пространство АТФ, которое усиливается с ростом деформации эритроцитов в капиллярном отделе кровотока [23].

Эритроциты морской лисицы и скорпены демонстрировали разную динамику генерации тепла для достижения максимума ΔT . Так, общая продолжительность процесса генерации тепла до максимума ΔT в суспензии эритроцитов морской лисицы была почти в четыре раза короче, чем у скорпены (рис. 1, 2). Такое течение процесса в эритроцитах морской лисицы можно объяснить большим количеством клеток используемой суспензии. Гематокрит суспензий эритроцитов морской лисицы составлял в экспериментах 50%, а у скорпены — только 30%. Кроме того, исходная температура добавляемой АТФ в суспензию ската была подобрана существенно лучше, ее перепад был всего $0,08^\circ\text{C}$ по сравнению с этим показателем для скорпены, где расхождение температурных показателей добавляемого субстрата и суспензии составляло $0,1889^\circ\text{C}$ (рис. 1, 2). В дополнение к вышеперечисленным фактам, процесс снижения температуры в ячейках с суспензией мог быть обусловлен или исчерпанием ресурса добавленной внеклеточной АТФ или блокировкой функциональной активности экто-АТФазы продуктами реакции. Факт того, что процесс снижения температуры в суспензии эритроцитов скорпены происходил в 2 с лишним раза более медленными темпами, чем у морской лисицы (рис. 1, 2), свидетельствует о том, что экто-АТФазы эритроцитов морской лисицы и скорпены различаются по своим свойствам. Эти различия могут быть обусловлены разной активностью экто-АТФаз исследованных рыб, сродством их к субстрату, а также влиянием на

активность энзимом продуктов гидролитического распада АТФ и др. [16].

Общий перепад температуры в ячейке с суспензией эритроцитов скорпены был на $0,2470^\circ\text{C}$ больше, чем у морской лисицы. Больше была у скорпены и амплитуда повышения ΔT ($0,22^\circ\text{C}$) относительно исходного уровня (рис. 2). Несмотря на очевидную разницу в амплитуде температурного ответа на добавление АТФ к суспензиям эритроцитов хрящевых и костистых рыб, для приведения этих опытов к сопоставимым условиям, необходимо произвести перерасчет прироста ΔT скорпены с учетом особенностей объема проб и величиной гематокрита клеточной суспензии. Так, полученный прирост необходимо разделить на 2,5 и умножить на 1,67. Таким образом, скорректированное ΔT скорпены составило $(0,22^\circ\text{C} : 2,5) \times 1,67 = 0,147^\circ\text{C}$. Ввод поправок обусловлен разным объемом суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены ($5,0 \text{ мл} : 2,0 \text{ мл} = 2,5$) и, соответственно, разной их теплоемкостью, а также разностью по гематокриту ($50\% : 30\% = 1,67$). Поправочные коэффициенты рассчитаны на основании предположения о линейной зависимости теплопродукции от объема и гематокрита суспензии. Расчет теплопродукционной активности эритроцитов скорпены с поправочными коэффициентами показал ($0,147 : 0,08$) в 1,84 раза более высокое значение, чем у морской лисицы. Этот результат хорошо согласовался с кратностью по активности экто-фермента ($\text{нмоль } \Phi_n / \text{мин} / \text{мкл RBC}$) у эритроцитов исследованных рыб ($6,4 : 3,4 = 1,88$) и свидетельствовал в пользу корректности полученных экспериментальных данных. Более высокую начальную скорость нарастания температуры в суспензии эритроцитов скорпены ($12,4^\circ\text{C}/\text{ч}$) по сравнению с морской лисицей ($9,2^\circ\text{C}/\text{ч}$) также можно объяснить более высокой активностью экто-фермента в эритроцитах морской ерша.

Таким образом, эритроциты хрящевых рыб — морской лисицы и костистой скорпены — отличались по своей способности генерировать тепло. Эритроциты скорпены в настоящем опыте демонстрировали большую теплопродукционную активность по расчетной амплитуде и по продолжительности генерации тепла. Возможно, большая продолжительность функциональной активности экто-АТФазы эритроцитов скорпены также обусловлена меньшей чувствительностью фермента у этой рыбы к побочным продуктам гидролиза АТФ по сравнению с ферментом эритроцитов морской лисицы.

Полученные результаты подтверждают наши предположения и свидетельствуют в пользу гипотезы о важности ферментативного теплового гидролиза АТФ экто-АТФазой для функционирования эритроцитов морской лисицы и скорпены. Важно отметить, что после окончания эксперимента в ячейке с суспензией клеток, в результате

естественного осаждения эритроцитов, надосадочная жидкость была совершенно прозрачной без признаков гемолиза. Отсутствие гемолиза в ячейке на протяжении всего эксперимента может быть надежным критерием того, что тепловыделение происходит за счет экто-АТФаз, а не за счет работы внутриклеточных Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -АТФаз.

Существует еще ряд фактов, которые свидетельствуют об участии экто-АТФаз в функционировании плазматической мембраны эритроцита и всего кровотока в целом.

Так, экспериментальным подтверждением возможного участия тепловой энергии гидролиза АТФ экто-АТФазами в изменении вязкоэластичных параметров их плазматических мембран явился факт, связанный с расхождением этих характеристик в цельных клетках и их «тенях» [24]. В «тенях» эритроцитов вязкость мембраны оказалась на 50% больше, чем в нативных клетках. Это свидетельствовало о том, что в нативных мембранах эритроцитов действовал фактор, способствующий снижению вязкости плазматической мембраны. Не менее интересным является отсутствие понимания физической природы 20-кратного падения вязкости крови в сосудах с диаметром меньше 300 мкм, названного эффектом Фареуса-Линдквиста [25]. Высокая теплопродукционная активность экто-АТФаз эритроцитов в микрососудах могла бы существенно продвинуть решение этого вопроса. И, наконец, нельзя пройти мимо факта наличия частичной «тепловыводности» у рыб с высокой экто-АТФазной активностью их эритроцитов. Как показывают исследования последних лет, имеют более высокую температуру тела примерно 2–2,5 тысячи малоподвижных рыб, что составляет около 0,1% от общего количества ныне живущих видов [26]. Исследования на планктоноядных гигантских, малоподвижных акулах *Cetorhinus maximus* [27] показали, что температура тела этих рыб была на 1,0–1,5°C выше температуры среды. Причины и источники этого феномена авторами не были определены. Ими было выдвинуто предположение о том, что более высокая температура тела этих рыб связана с физиологией кровеносной системы, а не с работой мышц. Не менее интересен факт наличия «тепловыводности» у красноперого Опаха (*Lampris guttatus*) [28]. У этой малоподвижной и живущей на большой глубине рыбы температурный перепад может составлять не менее 5°C. Авторы указывают на то, что эта рыба имеет теплую кровь, однако источником эндотермии они считают работу мышц грудных плавников. Как мы полагаем, такая разность температуры тела и окружающей среды может быть обусловлена наличием другого внутреннего источника эндотермии, на роль которого могла бы вполне претендовать экто-АТФаза эритроцитов рыб.

Заключение

Эволюция размерных характеристик эритроцитов и уровня гематокрита крови тесно связана с мощностью сердечной мышцы и ее способностью поддерживать такое кровяное давление, которое обеспечивает необходимый уровень транспорта кислорода к тканям и органам в соответствии с энергетическими потребностями организма. Крупные эритроциты у позвоночных, возможно, являются маркерами «слабого сердца», не способного создавать высокое кровяное давление. Рыбы — не исключение из этого правила. Крупные эритроциты обнаружены нами у тех видов рыб, которые характеризовались наличием слабого сердца, невысоким уровнем обмена и низкими показателями гематокрита (скаты, скорпена, звездочет). Напротив, у быстроплавающих активных костистых рыб (ставрида, смарида, налим) активность экто-АТФаз эритроцитов была низкой, как и размеры их эритроцитов. Полученные данные по размерам эритроцитов рыб и величине активности их экто-фермента положительно коррелировали между собой, что наводит на мысль о большей вовлеченности экто-АТФаз в регуляцию реологии кровотока. Капилляры являются самым труднопроходимым отделом кровотока, и крупные эритроциты, вероятно, нуждаются в механизмах, обеспечивающих облегченное преодоление этого отдела кровеносной системы. Мы полагаем, что экто-АТФазы плазматических мембран как раз и могут служить этим целям. Величина их активности пропорциональна размерным характеристикам эритроцитов рыб и составу плазматической мембраны этих клеток.

Хорошо известно, что крупные эритроциты легко преодолевают капилляры с меньшим диаметром, чем диаметр клеток. Выделение тепла за счет гидролиза АТФ на поверхности эритроцитов рыб может способствовать понижению вязкостных характеристик плазмы, плазматической мембраны и всего эритроцита в целом, что может значительно облегчить движение крупных эритроцитов в капиллярах.

Наличие теплопродукционной активности суспензий эритроцитов морской лисицы и скорпены является убедительным свидетельством использования тепловой энергии гидролиза АТФ эритроцитами рыб как для поддержания функционального состояния собственной плазматической мембраны, так и, возможно, для улучшения реологических характеристик в капиллярном отделе кровотока. Эти опыты демонстрируют факт, что в природе ничего не теряется бесследно. Тепло, как побочный продукт гидролитической активности поверхностных экто-АТФаз, используется позвоночными с ядерными эритроцитами гораздо шире, чем млекопитающими. У этих позвоночных экто-АТФазы являются не столько «выключателя-

ми» P2XY-рецепторной активности, сколько, как показали наши исследования, регуляторами функции источника локальной генерации тепла на поверхности эритроцита и, тем самым, глубоко интегрированы в жизнедеятельность клетки и всего кровотока в целом.

Исследование выполнено в рамках темы НИР «Изучение фундаментальных характеристик морских гидробионтов, обеспечивающих их функцио-

нирование в экосистемах и служащих основой их рационального использования и сохранения» (регистрационный номер 124030100100-0). Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63 EU) и положении ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными (протокол № 750д от 06.06.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Венкстерн Т.В., Энгельгардт В.А. Поверхностно-локализованная аденозин-полифосфатаза ядерных эритроцитов. *Докл. Акад. наук СССР*. 1955;102(1):133–136.
2. Венкстерн Т.В., Энгельгардт В.А. Распространение экто-аденозилполифосфатазы и характеристика некоторых ее свойств. *Биохимия*. 1957;22(5):911–916.
3. Bencic D.C., Yates T.J., Ingemann R.L. Ecto – ATPase activity of vertebrate blood cells. *Physiol. Zool.* 1997;70(6):621–630.
4. González-Alonso J., Olsen D. B., Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery. Role of circulating ATP. *Circ. Res.* 2002;91(11):1046–1055.
5. Jensen F.B., Agnisola C., Novak I. ATP release and extracellular nucleotidase activity in erythrocytes and coronary circulation of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2009;152(3):351–356.
6. Пищенко Е.В. *Гематология пресноводных рыб*. Новосибирск: Новосиб. Гос. Аграр. Ун-т; 2002. 48 с.
7. Girish V., Vijavalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/Image. *Indian J. Cancer*. 2004;41(1):41–47.
8. Acharya G., Mohanty P.K., Comparative cetomorphometry of red blood cells of some fishes. *African J. Biol. Sci.* 2019;1(1):23–32
9. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Савина Г.В. Сравнительная характеристика свойств Na^+ , K^+ - АТ-Фазы эритроцитов человека и карпа *Cyprinus carpio*. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 1984;20(2):167–173.
10. Казеннов А.М., Маслова М.Н. Особенности активации детергентами Na, К-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных. *Ж. эвол. биохим. физиол.* 1980;16(5):430–436.
11. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1956;28(11):1756–1758.
12. Stolbov A.Y., Mishurov V.G., Shadrin N.V. The macrocalorimetric method in hydrobiology: description of the pilot device. *Mar. Ecol.* 2009;77(3):94–96.
13. Mann T. Studies on the metabolism of semen. *Biochem. J.* 1945;39(5):451–458.
14. Rothstein A., Meier R. The relationship of the cell surface to metabolism I Phosphatases in the cell surface of living yeast cells. *J. Comp. Cell. Physiol.* 1948; 32(1) :77–95.
15. Sprague R.S., Stephenson A.H., Ellsworth M.L. Red not dead: signaling in and from erythrocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 2007;18(9):350–355.
16. Силкин Ю.А., Силкина Е.Н., Силкин М.Ю. Влияние солей азидо фторида, ортованадата и ЭДТА натрия на экто-АТФазную активность эритроцитов скорпены (*Scorpaena porcus* L.) и морской лисицы (*Raja clavata* L.). *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2021;57(5):380–391.
17. Glomski C.A., Tamburlin J., Hard R., Chatnani M. The phylogenetic odyssey of erythrocyte IV. *The amphibians. Hystol. Hystopathol.* 1997;12(1):147–170.
18. Лисничая Е.Н., Ефимов В.Г. Особенности исследования морфологического состава крови рептилий. *Научно-технічний бюлетень НОЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. 2014;2(1):1–13.
19. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 2012;8(3):437–502.
20. Yegutkin G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2014;49(6):473–497.
21. Кребс Е.М. *Липиды клеточных мембран*. Л.: Наука. 1981. 339 с.
22. Забеленский С.А., Чеботарева М.А., Шуколюкова Е.П., Никитина Е.Р., Кривченко А.И. Жирнокислотный состав фосфолипидов эритроцитов крысы при стрессе (длительное плавание). *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2019;55(1):37–42.
23. Wan J., Ristenpart W. D., Stone H.A. Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(43):16432–16437.
24. Aloni B., Shinitzky M., Livne A. Dynamics of erythrocyte lipids in intact cells, in ghost membranes and in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974;348(3):438–441.
25. Katiukhin L. N. About of mechanism of the Fahraeus-Lindquist-effec. *J. Blood Disorders Transf.* 2014;5(5):211–213.
26. Dickson K.A., Craham J. B. Evolution consequences of endothermy in fishes. *Physiol. Biochem. Zool.* 2004;77(6):998–1018.
27. Dolton H.R., Jackson A.L., Deavill R., Hall J., Hall G., McManus G., Perkins M.W., Rolfe R.A., Sneling E.P., Houghton J.D.R., Sims D.W., Payne N.L. Regionally endothermic traits in planktivorous basking sharks *Cetorhinus maximus*. *Endang. Species Res.* 2023;51(2): 227–232.
28. Wegner N.C., Snodgrass O.E., Dewar H., Hyde J.R. Whole-body endothermy in a mesopelagic fish, the opah, *Lampris guttatus*. *Science*. 2015;348(6236):786–789.

Поступила в редакцию 02.12.2024

После доработки 02.06.2025

Принята в печать 19.06.2025

RESEARCH ARTICLE

Ecto-ATPases, morphometry and heat production activity of erythrocytes of cartilaginous and teleost fishes of the Black Sea

Yu.A. Silkin¹*, M.Yu. Silkin¹, E.N. Silkina¹, S.O. Omelchenko²

¹ Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences – Branch of the Federal Research Center, Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Nauki st., 24, Kurortnoye settlement, Feodosia, 298188, Russia;

² Vernadsky Crimean Federal University, pr. Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007, Russia

*e-mail: ysilkin@mail.ru

The activity of ecto-ATPase and the size characteristics of erythrocytes in two species of cartilaginous and ten species of bony fishes, as well as the heat-production activity of the erythrocyte suspension in *Scorpaena porcus* and *Raja clavata* were studied. It was shown that the activity of ecto-ATPase of red blood cells (RBC) between cartilaginous fishes differs by 1.5 times and is 3.1 nmol Fn/min/μl RBC in *Raja clavata*, and 2.1 nmol Fn/min/μl RBC in *Dasyatis pastinaca*. Erythrocytes of teleost fish are characterized by a more significant variability of ecto-ATPase activity, which differed between its extreme values by more than 60 times (in *Scorpaena porcus* it was 6.4 nmol Fn/min/μl RBC, in *Spicara flexuosa* and some other species – 0.1 nmol Fn/min/μl RBC). When comparing the size characteristics of erythrocytes and the values of ecto-ATPase activity, a direct relationship was shown between these indicators. A study of heat production in suspensions of thresher and scorpionfish erythrocytes showed that adding ATP to a suspension of isolated cells (1 mg/ml) significantly increased the temperature in the experimental cell. The erythrocytes of the thresher and scorpionfish demonstrated different heat generation dynamics. Thus, ΔT generated by stingray erythrocytes was almost two times lower than in scorpionfish erythrocytes. The total duration of the heat generation process to the maximum ΔT in the thresher erythrocyte suspension was almost four times shorter than in the thresher. However, the process of temperature reduction in the thresher erythrocyte suspension occurred more than two times slower than in the thresher. The results obtained showed that ecto-ATPases of fish erythrocytes apparently function as a source of local heat generation on the erythrocyte surface and, thus, can be deeply integrated into the functioning of the cell membrane and the entire blood flow as a whole.

Keywords: fish, temperature, erythrocytes, cytomorphometry, ATP, heat production, ecto-ATPase

Funding: The study was carried out within the framework of the research topic “Study of the fundamental characteristics of marine hydrobionts that ensure their functioning in ecosystems and serve as the basis for their rational use and conservation” (No. 124030100100-0).

Сведения об авторах

Силкин Юрий Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией биохимии и физиологии гидробионтов Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел: 8-978-917-60-29; e-mail: ysilkin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1916-8327>

Силкин Михаил Юрьевич – канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатории биохимии и физиологии гидробионтов Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел: 8-978-917-60-29; e-mail: my.silkin@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7499-0375>

Силкина Елизавета Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатории биохимии и физиологии гидробионтов Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского. Тел: 8-978-917-60-29; e-mail: pater3@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2059-1015>

Омельченко Светлана Олеговна – канд. биол. наук, доц. кафедры общей биологии и генетики Института биохимических технологий, экологии и фармации, Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Тел.: 8-978-917-60-29; e-mail: svet.omelchenko@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8539-6487>

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](#)