

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 80 • № 3 • 2025 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Звягина В.И., Шитикова А.М., Атрощенко М.М., Марсянова Ю.А.,
Бельских Э.С., Мельников Д.О. Сигнальная роль отдельных
митохондриальных метаболитов в регулировании
митохондриального гомеостаза 137

Оригинальные исследования

- Кривина Е.С. Представители клады *Chlorella* в техногенном озере Отстойник
(Самарская область, Россия) в период самовосстановления 147
- Золотова Н.А., Кириллова М.В., Цветков И.С., Джалилова Д.Ш.,
Озерецкая Л.В., Добрынина М.Т., Макарова О.В.
Морфофункциональная характеристика модели острого умеренного колита,
индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей 156
- Хорунжий Г.Д., Егорова М.А., Фесенко З.С., Ефимова Е.В.
Сравнительное исследование слуховой чувствительности крыс линии Wistar
и крыс-гетерозигот со сниженной экспрессией гена транспортера
дофамина DAT-1 165
- Ершова Е.Г., Пименов В.Е., Гамова Н.С., Ершова М.А., Ашуркова Т.П.
История леса и современная флора Салтыковского лесопарка
(ближайшее Подмосковье) 173
- Тарасова Е.К., Лепеха Л.Н., Масютин А.Г., Шербакова Е.А.,
Ерохина М.В. Активность белка-транспортера Р-гр в макрофагах человека
усиливает эффект легочного сурфактанта как активатора фагоцитоза. 182
- Червицов Р.Н., Хрушев С.С., Фурсова П.В., Плюснина Т.Ю.
Оценка гетерогенности комплексов фотосистемы II клеток
водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях азотного голодания
с использованием математической модели 190
- Граф А.В., Маслова М.В., Маклакова А.С. Сравнительный анализ динамики
моторного и пространственного обучения у животных, переживших
пренатальную гипоксию 197

Мнения

- Хохлов А.Н. Определение старения: прошлое, настоящее и возможное будущее. . . 206

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2025

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 80 • No. 3 • 2025 • JULY — SEPTEMBER

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Reviews

- Zvyagina V.I., Shitikova A.M., Atroshchenko M.M., Marsyanova Yu.A.,
Belskikh E.S., Melnikov D.O. Signaling role of selected mitochondrial
metabolites in the regulation of mitochondrial homeostasis137

Research articles

- Krivina E.S. Representatives of the genus *Chlorella* in a technogenic lake Otstoynik
(Samara region, Russia) during the self-healing period147
- Zolotova N.A., Kirillova M.V., Tsvetkov I.S., Dzhililova D.Sh.,
Ozeretskaya L.V., Dobrynina M.T., Makarova O.V. The morphofunctional
profile of a mouse model of acute moderate dextran sodium sulfate-induced colitis. . . 156
- Khorunzhii G.D., Egorova M.A., Fesenko Z.S., Efimova E.V. Comparative
study of auditory sensitivity in normal Wistar rats and heterozygous rats
with reduced expression of the dopamine transporter (DAT-1) gene 165
- Ershova E.G., Pimenov V.E., Gamova N.S., Ershova M.A., Ashurkova T.P.
Forest history and modern flora of the Saltykovsky Forest Park (Moscow suburbs)173
- Tarasova E.K., Lepekha L.N., Masyutin A.G., Scherbakova E.A.,
Erokhina M.V. The activity of the transporter protein P-gp in human macrophages
enhances the effect of pulmonary surfactant182
- Chervitsov R.N., Khrushev S.S., Fursova P.V., Plyusnina T.Yu.
Estimation of heterogeneity of photosystem II complexes of *Chlorella vulgaris*
algae cells under nitrogen starvation using a mathematical model. 190
- Graf A.V., Maslova M.V., Maklakova A.S. The comparative analysis of motor
and spatial learning dynamics in animals survived prenatal hypoxia. 197

Opinion articles

- Khokhlov A.N. Defining aging: Past, present, and possible future 206

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

ОБЗОР

УДК 577.121.4



Сигнальная роль отдельных митохондриальных метаболитов в регулировании митохондриального гомеостаза

В.И. Звягина^{1,*} , А.М. Шитикова^{1,2} , М.М. Атрощенко² , Ю.А. Марсянова^{1,2} ,
Э.С. Бельских³ , Д.О. Мельников³

¹Кафедра биологической химии, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Минздрава РФ, Россия, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9;

²Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, Россия, 391105, Рязанская обл., п. Дивово, д. 20;

³Кафедра факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Минздрава РФ, Россия, 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

*e-mail: vizvyagina@yandex.ru

Настоящий обзор систематизирует современные данные о сигнальной роли митохондриальных метаболитов в регуляции митохондриального гомеостаза, с акцентом на их влияние на адаптацию клетки к стрессовым факторам, включая возрастные изменения. Митохондрии выступают не только как источники энергии, но и как ключевые сенсоры и регуляторы, опосредующие антероградную и ретроградную сигнализацию через метаболиты, такие как цитрат, сукцинат, лактат и L-карнитин. Цитрат и сукцинат участвуют в эпигенетических модификациях, включая ацетилирование и сукцинирование белков, влияя на экспрессию генов и метаболическую адаптацию, с потенциальными применениями в терапии онкологических и возраст-ассоциированных заболеваний. Лактат, традиционно рассматриваемый как продукт анаэробного метаболизма, функционирует как сигнальная молекула, модулирующая рецепторные каскады (GPR81), лактирование гистонов и окислительное фосфорилирование в митохондриях. L-карнитин обеспечивает метаболическую гибкость, поддерживая баланс ацил-KoA/KoA, удаляя токсичные метаболиты и повышая биодоступность оксида азота, что демонстрирует его протективные эффекты в моделях гипергомоцистемии и дефицита NO. Понимание этих механизмов открывает перспективы для идентификации биомаркеров митохондриальной дисфункции и разработки терапевтических стратегий, направленных на восстановление гомеостаза в контексте старения, метаболических расстройств и геронтологических синдромов.

Ключевые слова: митохондрии, цитрат, сукцинат, лактат, L-карнитин, NO, возрастная дисфункция

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-7

Введение

До недавнего времени метаболизм рассматривался как пассивный процесс, адаптирующийся к потребностям клетки [1]. Однако исследования последнего десятилетия показали, что метаболиты служат не только субстратами для биохимических реакций, но и выполняют роль сигнальных молекул, опосредуя свои функции через метаболические пути и через влияние на активность регуляторных белков. При этом митохондрии играют крайне важную роль в реализации этих процессов [1, 2]. Наряду с этим детальные механизмы ответа митохондрий на стрессовые стимулы, особенно роль отдельных метаболитов как сигнальных агентов, остаются разрозненными и продолжают исследоваться как в фундаментальном,

так и в прикладном аспекте [1–3]. Понимание закономерностей изменения митохондриального метаболизма на разных стадиях прогрессирования заболеваний или старения крайне важно для поиска биомаркеров митохондриальных нарушений, которые смогут помочь в оценке течения заболеваний и патологических состояний [4]. Митохондриальная дисфункция, характеризующаяся окислительным повреждением и нарушением биоэнергетики, ускоряет клеточное старение и способствует патогенезу геронтологических синдромов, включая хрупкость и когнитивный упадок [5]. С другой стороны, накопление знаний о молекулярных и клеточных механизмах митохондриальных расстройств может способствовать развитию корректирующих терапевтических подходов [6].

В этом контексте целью данного обзора является систематизация данных о сигнальной роли ряда митохондриальных метаболитов в регулировании митохондриального гомеостаза и их значении в контексте возрастных метаболических нарушений.

Пути передачи сигналов с участием митохондрий

Хорошо известно, что в ответ на изменяющиеся потребности клетки регуляция происходит на нескольких уровнях, включая транскрипционную и трансляционную активность, а также посттрансляционные модификации. Эти изменения могут приводить к повышению эффективности митохондрий либо за счет увеличения их количества или объема, усиления экспрессии белковых субъединиц, участвующих в окислительном фосфорилировании, либо посредством изменений в сопряжении тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования. Эта регуляторная гибкость управляется как антероградными (от ядра к митохондриям), так и ретроградными (от митохондрий к ядру) сигнальными путями [7].

Антероградная сигнализация опирается на транскрипцию и транспорт продуктов генов, связанных с биогенезом митохондрий, позволяя митохондриям адаптировать свою выработку энергии и биосинтез в соответствии с потребностями клетки [7]. Ретроградная сигнализация, запускаемая митохондриальным стрессом, включает изменения в производстве активных форм кислорода, потенциала мембраны митохондрий, уровня цитозольного кальция, а также соотношений НАДН/НАД⁺ и АТФ/АДФ [8].

Дисфункция митохондрий инициирует ретроградную сигнализацию, запускающую ответы на стрессовые сигналы, которые могут варьироваться от корректировки метаболических путей до удаления поврежденных белков и органелл посредством аутофагии. Одним из ключевых факторов, соединяющих окислительный стресс и митохондриальный метаболизм, является коактиватор 1-альфа рецептора гамма, активируемого пролифератором пероксисом (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha, PGC-1 α), который играет решающую роль в биогенезе митохондрий. PGC-1 α активирует экспрессию ядерных факторов дыхания 1 и 2 (Nuclear Respiratory Factor 1, NRF-1; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF-2), которые необходимы для усиления экспрессии генов, участвующих в процессах поддержания митохондриального гомеостаза в условиях окислительного стресса [9]. Помимо регуляции митохондрий, PGC-1 α координирует более широкие метаболические функции, включая глюконеогенез, транспорт глюкозы и липогенез. Истощение и нарушение адаптивных процессов приводят к гибели клеток через механизмы ретроградной сигнализации, опосредующей апоптоз, ферроптоз или пироптоз, в зависимости от типа сигнала

и клетки [10]. Предположительно, модуляция активности PGC-1 α , направленная на усиление митохондриального биогенеза и повышение устойчивости к стрессу, рассматривается как перспективный подход к смягчению проявлений возрастной дисфункции митохондрий и продлению здорового долголетия [11].

Адаптация к стрессу — процесс, известный как аллостаз — требует значительных энергетических затрат [12]. При этом сигналы об изменении в потребности и доступности энергии передаются через коррекцию уровней промежуточных митохондриальных метаболитов, таких как ацетил-КоА, цитрат, α -кетоглутарат, сукцинат, НАД⁺, а также других активных соединений, влияя на экспрессию генов [7, 13].

Таким образом, митохондрии служат сенсорами стресса, генерируя различные формы ответа, которые могут активировать адаптивные механизмы или, в тяжелых случаях, инициировать программируемую гибель клеток.

Цитрат, сукцинат и лактат как метаболические интермедиаты-регуляторы

Этот обзор посвящен нескольким промежуточным метаболитам, включая те, которые производятся митохондриями и служат не только энергетическими субстратами, но и важными регуляторами метаболизма.

Известно, что ацетилирование играет ключевую роль в организации структуры хроматина и поддержании базового уровня экспрессии генов, демонстрируя связь митохондриального метаболизма с ростом и пролиферацией клеток [13, 14]. В этих процессах важную роль среди митохондриальных метаболитов играет цитрат, который синтезируется внутри митохондрий цитратсинтазой и затем транспортируется в цитоплазму. Там он превращается АТФ-цитратлиазой в ацетил-КоА, который является основным субстратом для ацетилирования гистонов [3, 14, 15]. Кроме того, удаление эпигенетических меток, таких как деметилирование гистонов и ДНК, также зависит от митохондриальных промежуточных продуктов — например, таких как α -кетоглутарат, который служит необходимым кофактором в этих процессах [14, 15]. Нарушение метаболизма цитрата наблюдается при различных патологиях — в частности, при ожирении, диабете, воспалении и злокачественных новообразованиях. При этом в последнем случае обнаружено, что низкий уровень цитрата является одним из ключевых звеньев, способствующих эффекту Варбурга. Данный феномен лежит в основе изучения нового направления в терапии онкологических заболеваний, так как, с одной стороны, поглощение цитрата раковыми клетками может быть заблокировано, например, путем ингибирования мембранного транспорта, а с другой — рост раковых клеток мо-

жет быть заторможен путем повышения в них концентрации цитрата (в 30–50 раз выше физиологического уровня) с целью ингибирования гликолиза [15].

Другим важным промежуточным продуктом цикла Кребса является итаконат, получаемый при декарбоксилировании цис-аконитата. Изначально было показано, что он ингибирует сукцинатдегидрогеназу (СДГ), предотвращая дальнейшее превращение сукцината. Недавние исследования указали, что итаконат может индуцировать повышенную экспрессию антиоксидантного транскрипционного фактора NRF2 и обладает электрофильными свойствами, которые могут нарушать взаимодействие KEAP1 с NRF2 [15].

Янтарная кислота также действует как паракринный мессенджер, активируя сопряженный с G-белком рецептор GPR91 (SUCNR1) [15]. Исследования показывают, что активация рецептора происходит через ингибирование аденилатциклазы, снижение активности протеинкиназы A и высвобождение внутриклеточного кальция. Эти пути сходятся в едином механизме, сигнализирующем о недостатке кислорода и метаболических нарушениях [15, 16]. Сукцинирование белков имеет адаптивное значение, при этом около 70% белковых мишеней, подвергающихся этой модификации, находятся в митохондриях. Ключевые белки, включая термогенин, глутаматдегидрогеназу, АТФ-синтазу и СДГ, проявляют сниженную активность из-за сукцинирования [16]. Метаболические интермедиаты цикла Кребса также образуются в ядре, где они влияют на эпигенетическое и транскрипционное ремоделирование.

Степень сукцинирования определяется доступностью сукцинил-КоА — продукта, образующегося под действием комплекса α -кетоглутаратдегидрогеназы (α -КГДГ) и сукцинил-КоА-синтетазы в митохондриях, а также в результате окисления жирных кислот в пероксисомах. α -КГДГ не только участвует в производстве субстратов, но и напрямую влияет на сукцинирование. Изменения в активности ферментов, такие как снижение активности сукцинил-КоА-синтетазы, могут привести к стимуляции сукцинирования, особенно в условиях окислительного стресса и гипоксии [17]. Сукцинирование белков вне митохондрий, например, в цитоплазме или ядре, запускается метаболическим дисбалансом, расширяя роль сукцината за пределы энергетической регуляции, включая сигнализацию, модификацию белков и регуляцию их активности [18].

Интерес к роли лактата в митохондриальной адаптации стремительно растет, хотя механизмы его действия *in vivo* остаются до конца не ясными. Ранее лактат рассматривали прежде всего как маркер анаэробного метаболизма. Современные данные показывают, что это важный метаболит с широким спектром функций: источник энергии,

предшественник для глюконеогенеза и сигнальная молекула [19, 20].

Лактат поступает в митохондрии через митохондриальный лактат-окисляющий комплекс (mLOC), в состав которого входят монокарбоксилатный транспортер 1, мембранный шаперон базигин (CD147), лактатдегидрогеназа и цитохромоксидаза [20, 21]. В межмембранном пространстве, по данным ряда работ, лактат окисляется до пирувата [19–21]. Далее предполагается транспорт пирувата в матрикс и его вовлечение в энергетический обмен. Согласно Бруксу и соавт., этот путь обеспечивает вклад лактата в митохондриальную энергетику [19]. В то же время Гленси ставит под сомнение осуществимость митохондриального окисления лактата с термодинамических позиций и предлагает альтернативное объяснение: высокая концентрация лактата может изменять мембранный потенциал митохондрий и тем самым опосредованно влиять на окислительное фосфорилирование [21].

Лактат активирует рецептор GPR81 — G-белок-сопряженный рецептор, экспрессируемый в жировой ткани, почках, скелетных мышцах, сердце, центральной нервной системе и ряде других органов [22]. Активация GPR81 приводит к ингибированию аденилатциклазы, снижению уровня цАМФ и активности протеинкиназы A. Эти изменения подавляют гликогенолиз и ограничивают поступление глюкозы в гликолитический путь. В результате перераспределяются метаболические потоки и повышается вовлеченность лактата в общий энергетический обмен. Через модуляцию внутриклеточного сигналинга GPR81 оказывает влияние на митохондриальные процессы, включая интенсивность окислительного фосфорилирования.

Лактат вовлечен и в эпигенетическую регуляцию. Посттрансляционная модификация гистонов в виде лактирования остатков лизина связывает метаболические сдвиги с программой экспрессии генов [23, 24]. Помимо этого, ферменты гликолиза могут подвергаться неферментативному лактированию. Сам лактат выступает эндогенным ингибитором гистондеацетилаз, что приводит к уменьшению компактизации хроматина и облегчает активацию транскрипции [25]. В совокупности эти механизмы показывают, как один метаболит способен одновременно перераспределять субстратные потоки, запускать рецепторные каскады и перестраивать транскрипционный ответ клетки. Таким образом, современное представление о лактате выходит далеко за рамки его традиционной роли.

Нарушение регуляции уровней метаболитов с возрастом, например, повышение уровня сукцината или изменения транспорта лактата, способствуют эпигенетическим сдвигам, которые, в свою очередь, приводят к хроническому низкоинтенсивному воспалению и к нарушению метаболической гибкости — признакам геронтологической патологии [26]. Восстановление баланса в сигнала-

лизации цитрата и сукцината может облегчить возраст-ассоциированное воспаление и улучшить клеточную адаптацию к окислительному стрессу [26]. Предполагаемые механизмы взаимосвязи между митохондриальными метаболитами и регуляцией экспрессии генов представлены на рис. 1.

Роль L-карнитина в системе митохондриального гомеостаза

L-карнитин наиболее известен своей ролью переносчика жирных кислот в митохондрии. Поэтому до настоящего времени он рассматривался как важный кофактор в β -окислении жирных кислот. Важно отметить, что карнитинацилтрансферазы I и II (Carnitine Palmitoyltransferase I, CAT I; Carnitine Palmitoyltransferase II, CAT II), карнити-

нацилтрансферазы и свободный карнитин вместе образуют систему, ответственную не только за транспорт жирных кислот, но и за модуляцию внутриклеточного пула ацил-КоА/КоАSH [27]. В свою очередь, КоАSH необходим для катаболизма аминокислот, элиминации ксенобиотиков, функционирования пируватдегидрогеназного (ПДК) и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплексов (α -КГДГ). В митохондриях свободный карнитин может образовывать ацетил-L-карнитин, который имеет решающее значение для образования свободного КоА из ацетил-КоА. Поэтому дефицит карнитина, ведущий к снижению КоАSH, будет опосредовать не только уменьшение окисления жирных кислот, но и нарушение утилизации углеводов и аминокислот [27, 28].

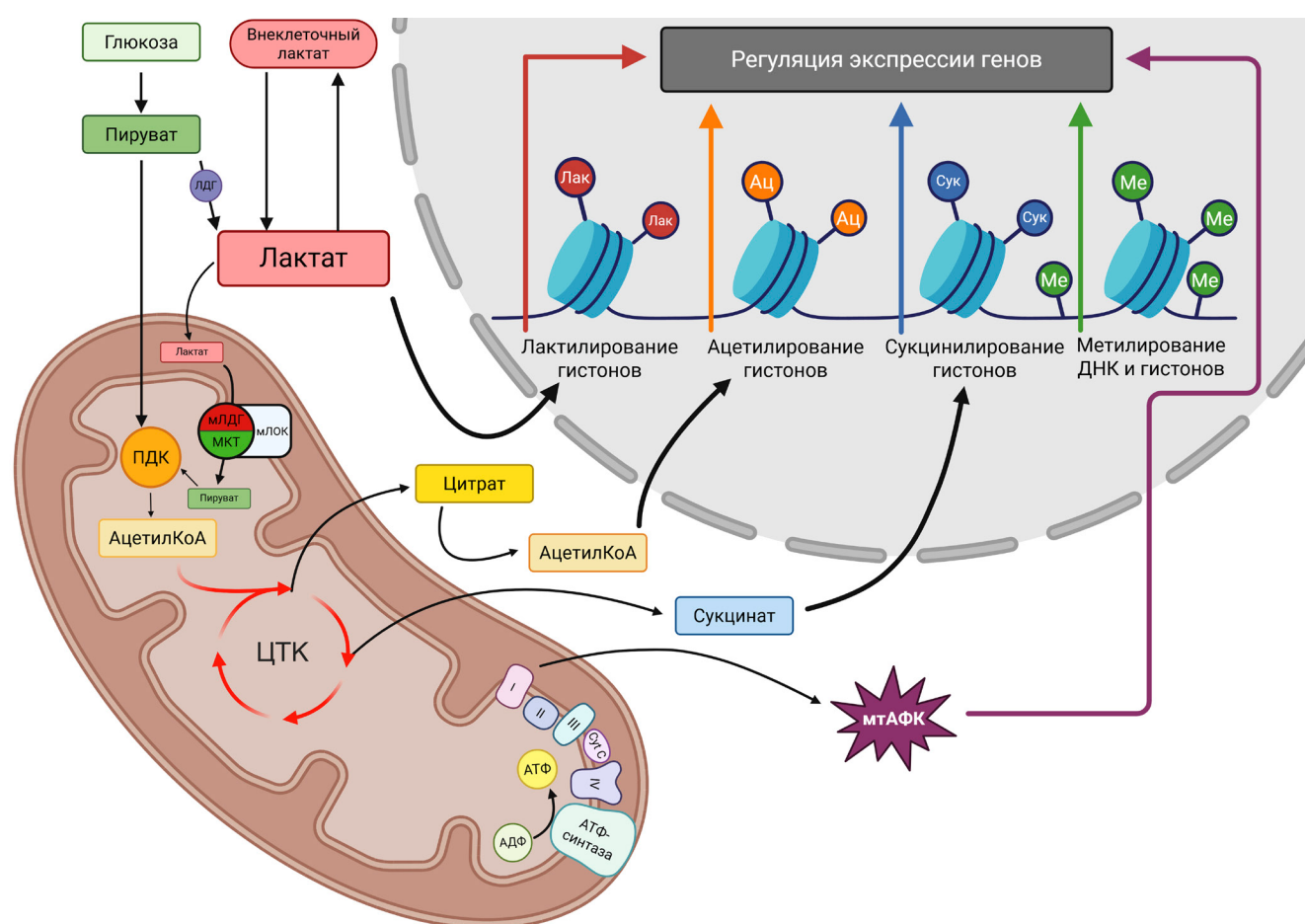


Рис. 1. Митохондриальные промежуточные метаболиты как регуляторы активности генов.

Примечание: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, мЛДГ – митохондриальная лактатдегидрогеназа, мЛОК – митохондриальный лактат-окисляющий комплекс, МКТ – монокарбоксилатный транспортер, ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, Ац – ацетилирование, Лак – лактирование, Сук – сукцинирование, Ме – метилирование, мТАФК – митохондриальные активные формы кислорода. Пул лактата пополняется за счет превращения глюкозы в пируват и транспорта внеклеточного лактата. В митохондриях лактат вновь переходит в пируват и далее при участии пируватдегидрогеназного комплекса превращается в ацетил-КоА. В итоге лактат используется и как источник ацетильных групп для ацетилирования гистонов, и также принимает участие непосредственно в лактировании (Лак) гистонов, что влияет на регуляцию транскрипционных программ адаптации. Экспорт митохондриального цитрата с последующим образованием ацетил-КоА в цитозоле и ядре усиливает ацетилирование гистонов и активацию экспрессии генов. Накопление сукцината повышает образование сукцинил-КоА для сукцинированных белков и ограничивает деметилирование, сдвигая баланс в сторону метилирования ДНК и гистонов. Побочная генерация мТАФК обеспечивает ретроградную сигнализацию и модифицирует экспрессию генов стресса. Совокупно указанные контуры согласуют энергетический статус клетки с эпигенетической регуляцией, поддерживая и восстанавливая митохондриальный гомеостаз при стрессовых воздействиях.

Created in BioRender. Belskikh, E. (2026) <https://BioRender.com/h73r340> (Лицензионное соглашение EI28VCRG1W)

Помимо регуляторных эффектов модуляции пула КоASH, продемонстрировано, что L-карнитин может также влиять на стабильность мембран лизосом и вносить таким образом вклад в регуляцию активности ферментов [29].

Снижение уровня L-карнитина с возрастом, возможно, опосредует нарушение транспорта жирных кислот в митохондриях и усугубляет окислительный стресс, ускоряя саркопению и сердечно-сосудистое старение [5, 27]. Вмешательства с добавлением L-карнитина продемонстрировали перспективность его применения для коррекции возраст-индуцированной митохондриальной дисфункции и уменьшения нарушений метаболической гибкости в доклинических моделях [27, 30–32].

Накопление длинноцепочечных, а по некоторым данным и короткоцепочечных, ацил-КоА и конъюгатов ксенобиотиков с КоА, вызванное метаболической дисфункцией или ксенобиотиками, снижает уровни свободного митохондриаль-

ного КоASH. L-карнитин может связывать эти длинноцепочечные ацильные группы и ксенобиотики, освобождая КоASH путем образования производных в виде эфиров карнитина, которые экспортируются из митохондрий и в итоге покидают клетку (рис. 2) [27].

Учитывая роль L-карнитина в удалении токсичных метаболитов, связанных с β -окислением жирных кислот и митохондриальной дисфункцией, низкая активность карнитинацилтрансферазы и сниженные уровни L-карнитина могут быть связаны с метаболической негибкостью митохондрий, то есть неспособностью организма (клетки) реагировать на изменения метаболических или энергетических потребностей [27, 33, 34] и адаптироваться к ним. Эта концепция используется, например, для объяснения механизмов, регулирующих выбор клеткой источника энергии между глюкозой и жирными кислотами, подчеркивая нарушение гибкости метаболизма у пациентов с диабетом 2 типа и ожирением [27, 33].

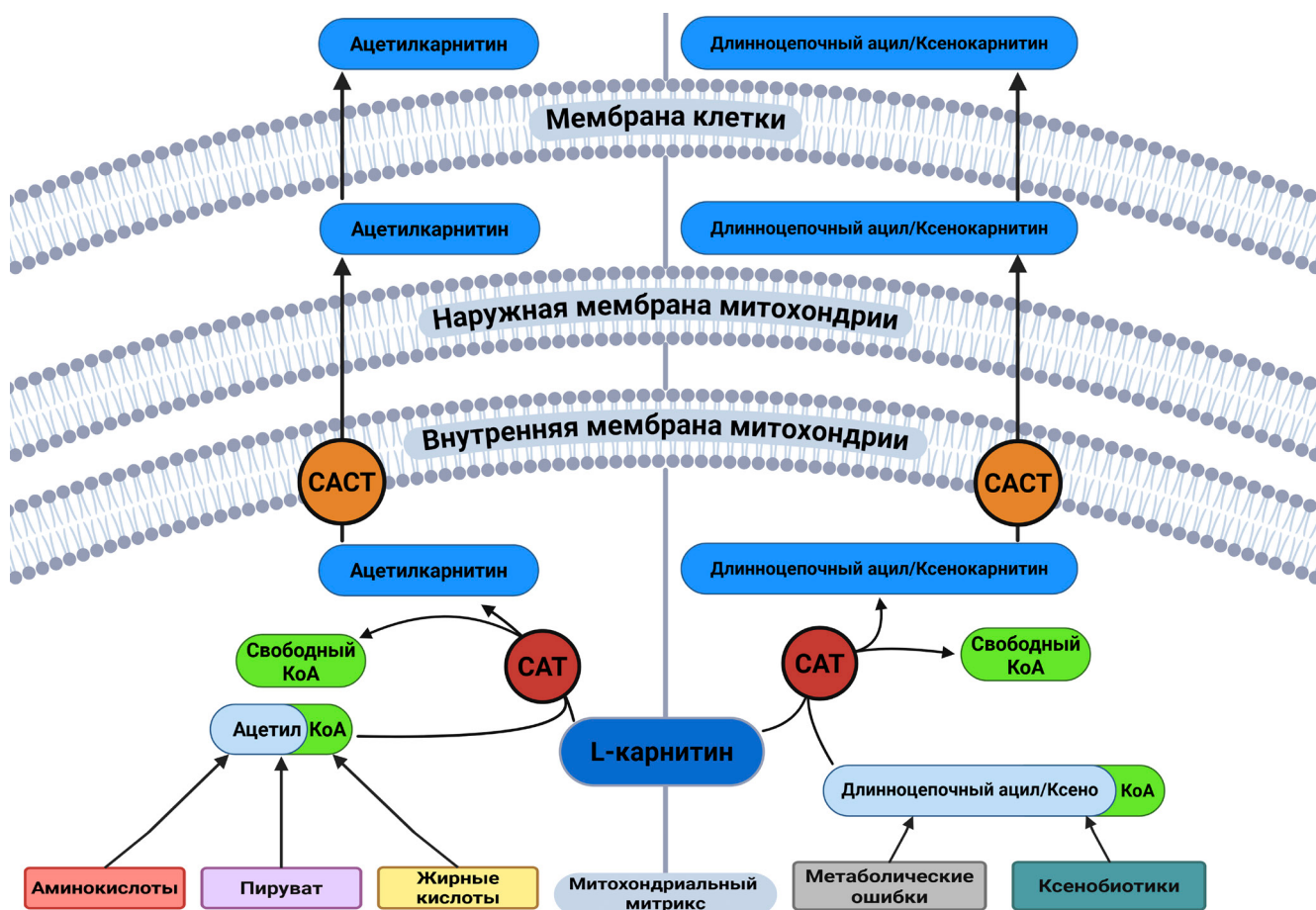


Рис. 2. Регуляция L-карнитином соотношения ацетил-КоА/КоASH внутри митохондрий и участие в удалении ксенобиотиков из митохондриального матрикса.

Примечание: CACT (carnitine acyl translocase) – карнитинацилтрансфераза, CAT (carnitine acyl transferase) – карнитинацилтрансфераза. В матриксе CAT обратимо переводит ацетил-КоА в ацетилкарнитин, высвобождая свободный КоА и тем самым поддерживая соотношение ацетил-КоА/КоASH для реакций окисления пирувата, аминокислот и жирных кислот. Длинноцепочечные ацил-КоА и конъюгаты ксенобиотиков с КоА, возникающие при метаболических ошибках и воздействии ксенобиотиков, этерифицируются в соответствующие эфиры карнитина; CACT обеспечивает их перенос через внутреннюю мембрану и последующий вывод из митохондрий и клетки. Экспорт ацил- и ацетилкарнитина предотвращает захват КоА в форме тиоэфиров, поддерживает метаболическую гибкость и сохраняет митохондриальный гомеостаз.

Created in BioRender. Belskikh, E. (2026) <https://BioRender.com/v77o091> (Лицензионное соглашение EI28VCRG1W)

Высокие уровни ацетил-КоА и избыток питательных веществ нарушают метаболические сигнальные пути. Такие состояния, как заболевания почек, жировая болезнь печени, инсулинорезистентность, нейродегенеративные заболевания, синдром хронической усталости и проблемы с фертильностью, часто связаны с метаболической негибкостью, вызванной нарушениями в карнитинном цикле. Косвенными маркерами таких состояний могут быть дефицит L-карнитина и повышенный уровень длинноцепочечных ацилкарнитиннов в плазме крови и моче [35].

Помимо регуляторной роли карнитина в модуляции пула КоASH, установлены взаимосвязи между карнитином и продукцией оксида азота (NO). В этом аспекте примечательны работы, которые продемонстрировали, что снижение продукции NO может привести к нарушению гомеостаза карнитина, в то время как использование экзогенного карнитина может повысить биодоступность

и способствовать увеличению продукции NO [35, 36]. Другими исследователями было продемонстрировано, что длительный прием L-карнитина вызывает такие эффекты, как снижение артериального давления и выраженности эндотелиальной дисфункции [37].

Учитывая вышеупомянутую регуляторную роль L-карнитина, имеются основания изучения возможностей его применения для усиления адаптивного потенциала митохондрий. Нам удалось выявить протективные сдвиги в показателях функций митохондрий на фоне приема L-карнитина в экспериментальных моделях гипергомоцистеинемии и дефицита NO, вызванного введением неселективного ингибитора NO-синтаз — метилового эфира L-N^G-нитроаргинина (L-N^G-Nitroarginine Methyl Ester, L-NAME) [37, 38]. В частности, как в модели L-NAME, так и при моделировании гипергомоцистеинемии использование L-карнитина было связано с большим уровнем метаболитов NO.

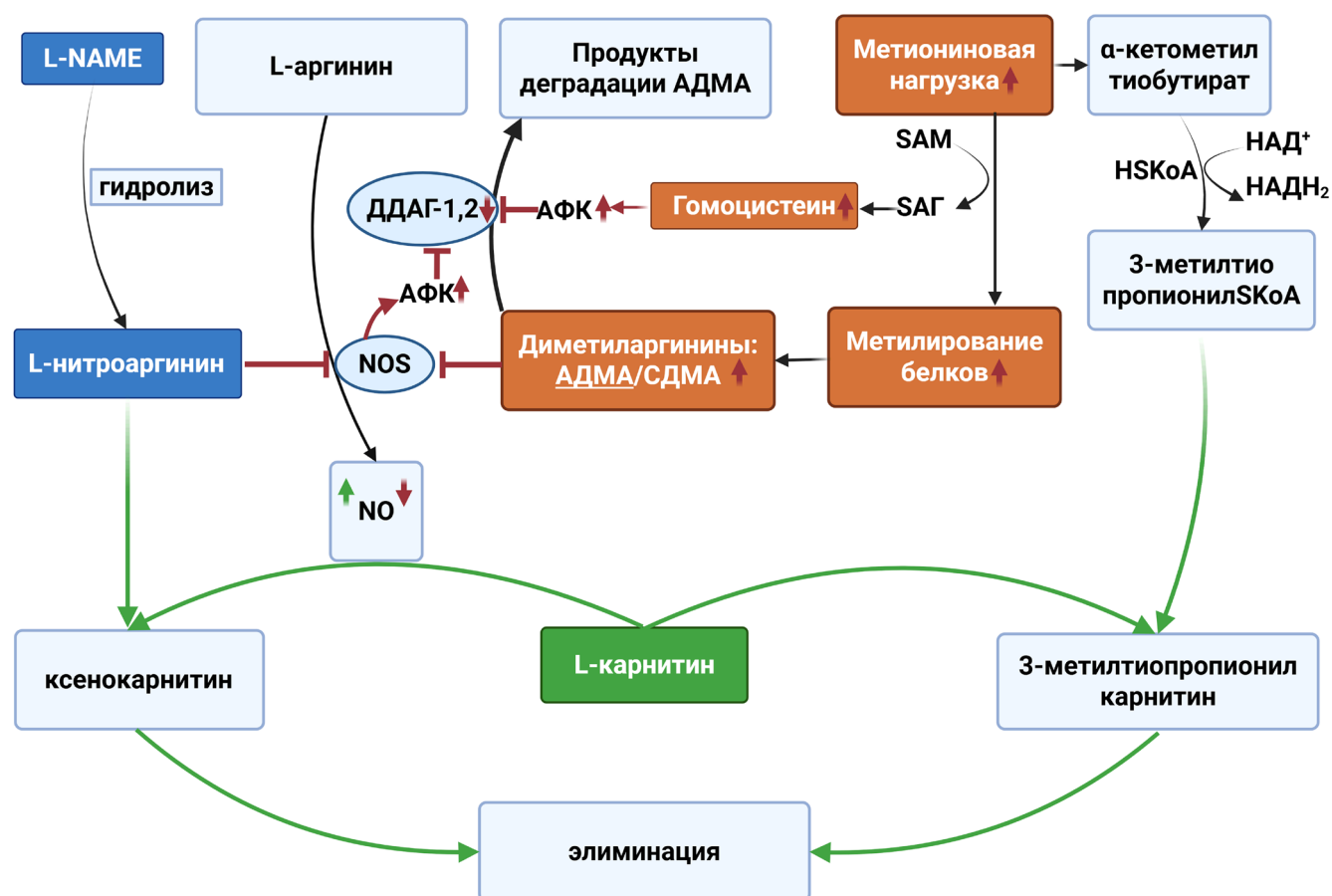


Рис. 3. Предложенный механизм снижения концентрации метаболитов L-NAME и метионина L-карнитином в экспериментальных моделях.

Примечание: NOS — синтаза оксида азота, АДМА/СДМА — асимметричный и симметричный диметиларгинин, ДДАГ — диметиларгинин-диметиламиногидролаза, SAM — S-аденозилметионин, SAG — S-аденозилгомоцистеин. Ингибирование NOS под действием L-NAME и последовательная конверсия метионина через SAM и SAG сопровождаются повышенным образованием эндогенных ингибиторов NOS — АДМА и СДМА. L-карнитин, образуя ацилкарнитины и карнитиновые эфиры ксенобиотиков или их метаболитов и тем самым увеличивая пул свободного КоASH, облегчает выведение токсичных производных и, вероятно, снижает концентрации АДМА и СДМА. Одновременно поддержка активности DDAH ускоряет гидролиз АДМА. В результате ослабляется торможение NOS, возрастает биодоступность оксида азота и поддерживается митохондриальный и сосудистый гомеостаз.

Created in BioRender. Belskikh, E. (2026) <https://BioRender.com/s5brpk5> (Лицензионное соглашение DP28WN11JW)

Этот эффект был наиболее выражен в плазме крови, что соответствует результатам Шармы [33]. Механизм этого явления, на наш взгляд, предположительно связан с детоксицирующей функцией L-карнитина и удалением эфиров карнитина с ксенобиотиками и их производными. Обзор научных источников позволяет предположить, что эффект карнитина, связанный с повышенной продукцией NO, может быть достигнут путем снижения концентрации диметиларгининов (ADMA и CДМА), которые, как известно, ингибируют синтазу оксида азота (Nitric Oxide Synthase, NOS). Таким образом, L-карнитин может потенциально предотвращать нарушения, вызванные дефицитом NO [33, 38, 39].

Модель предложенных эффектов карнитина как регуляторного метаболита, уровень которого определяет адаптивные возможности митохондрий, представлена на рисунке 3. Дальнейшие исследования, проверяющие эту гипотезу, представляются чрезвычайно важными, поскольку они могут открыть новые перспективы для клинического применения L-карнитина, особенно в контексте заболеваний, связанных с сосудистой дисфункцией и нарушениями эндотелия [36–42].

Таким образом, L-карнитин поддерживает функцию митохондрий и метаболическую гибкость, предотвращает накопление длинноцепочечных ацильных радикалов, способствуя их удале-

нию, сохраняет баланс ацил-КоА/КоА и улучшает биодоступность NO. Дальнейшее исследование механизмов регуляторных эффектов карнитина способно выявить новые точки приложения для его использования в лечении и профилактике различных патологий, особенно связанных с эндотелиальной дисфункцией и метаболизмом оксида азота.

Обобщающее представление о связях отдельных митохондриальных метаболитов, ключевых механизмов их сигнальных путей, эпигенетических эффектах и возможных ассоциированных состояниях, имеющих клиническое значение, приведено в таблице.

Заключение

Накопление экспериментальных данных о сигнальной роли митохондрий и их метаболитов в регуляции клеток приводит к новому пониманию функционирования этих органелл как в физиологических состояниях (митохондрии как сенсор гомеостатических сдвигов), так и в патогенезе широкого спектра заболеваний (дисфункциональные митохондрии как источник патологической неадаптивной сигнализации). В этом контексте становится важным пересмотреть роли низкомолекулярных соединений — таких как цитрат, лактат, сукцинат и L-карнитин — не только как митохондриальных метаболитов, но и как потенциальных

Таблица

Сигнальные функции отдельных митохондриальных метаболитов: мишени, эффекты, ассоциированные патологические состояния

Метаболит	Ключевые механизмы и сигнальные пути	Эпигенетические и посттрансляционные модификации	Ассоциированные патологические состояния	Источники
Цитрат	Источник цитозольного ацетил-КоА, участие в активации программ биосинтеза и роста.	Ацетилирование гистонов — донор ацетильных групп; опосредованное влияние на α-КГ-зависимые демодификации.	Ожирение, СД 2 типа, воспаление.	[11–13]
Сукцинат	Внеклеточный сигналинг через SUCNR1/GPR91, влияние на аденилатциклазу и PKA, связь с СДГ и пулом сукцинил-КоА.	Сукцинирование белков	Гипоксические и метаболические нарушения, состояния с выраженным окислительным стрессом.	[13–16]
Итаконат	Ингибирование СДГ, электрофильное взаимодействие с KEAP1 и активация NRF2	Электрофильные ковалентные модификации белков-мишеней KEAP1 — NRF2	Иммунометаболическая адаптация.	[13]
Лактат	Активация GPR81, утилизация лактата митохондриями (MCT1, CD147, мЛДГ; вопрос остается дискуссионным)	Лактирование гистонов; неферментативное лактирование гликолитических ферментов; ингибирование активности HDAC	Метаболическая адаптация при физической нагрузке и стрессе	[17–23]
L-карнитин	Модуляция пула ацил-КоА/КоASH; элиминирует токсичные метаболиты, влияние на биодоступность NO	Прямые специфические ПТМ не описаны; возможно опосредованное влияние на ацетилирование через контроль доступности ацетил-КоА/КоASH	СД 2 типа, ожирение; эндотелиальная дисфункция, нарушение фертильности.	[24, 25, 27–29, 30–33]

Примечание: α-КГ — α-кетоглутарат; SUCNR1 (GPR91) — рецептор сукцината; PKA — протеинкиназа А; СДГ — сукцинатдегидрогеназа; КоА — коэнзим А; KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1 — белок-субстратный адаптер (ингибитор NRF2); NRF2 — транскрипционный фактор NFE2L2; GPR81 — рецептор лактата; MCT1 — монокарбоксилатный транспортер 1; CD147 — базигин; мЛДГ — митохондриальная лактатдегидрогеназа; HDAC — гистондеацетилаза; КоASH — восстановленная форма коэнзима А; ПТМ — посттрансляционные модификации, СД 2 типа — сахарный диабет 2 типа.

маркеров стрессовых реакций и/или адаптивных физиологических состояний. Одновременно возникают новые предпосылки для прикладных исследований в биомедицине — взаимосвязи между уровнями митохондриальных метаболитов, которые могут служить потенциальными биомаркерами для диагностики и точками приложения для разработки терапевтических подходов. Эти идеи подчеркивают роль митохондрий как центральных регуляторов продолжительности здоровой жизни, где дисбаланс метаболитов создает предпосылки для развития возрастной хрупкости и полиморбидности [40].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Picard M., Shiriha O.S. Mitochondrial signal transduction. *Cell Metab.* 2022;34(11):1620–1653.
2. Arnold P.K., Finley L.W.S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J. Biol. Chem.* 2023;299(2):102838.
3. Collier J.J., Oláhová M., McWilliams T.G., Taylor R.W. Mitochondrial signalling and homeostasis: from cell biology to neurological disease. *Trends Neurosci.* 2023;46(2):137–152.
4. Suomalainen A., Nunnari J. Mitochondria at the crossroads of health and disease. *Cell.* 2024;187(11):2601–2627.
5. Sun N., Youle R.J., Finkel T. The mitochondrial basis of aging. *Mol. Cell.* 2016;61(5):654–666.
6. Behl T., Makkar R., Anwer M.K., Hassani R., Khuwaja G., Khalid A., Mohan S., Alhazmi H.A., Sachdeva M., Rachamalla M. Mitochondrial dysfunction: A cellular and molecular hub in the pathology of metabolic diseases and infection. *J. Clin. Med.* 2023;12(8):2882.
7. Walker B.R., Moraes C.T. Nuclear-mitochondrial interactions. *Biomolecules.* 2022;12(3):427.
8. Saki M., Prakash A. DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;107:216–227.
9. Rius-Pérez S., Torres-Cuevas I., Millán I., Ortega Á.L., Pérez S. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020;2020:1452696.
10. Jazwinski S.M., Kriete A. The yeast retrograde response as a model of intracellular signaling of mitochondrial dysfunction. *Front. Physiol.* 2012;3:139.
11. Zhang X., Gao Y., Zhang S., Wang Y., Pei X., Chen Y., Zhang J., Zhang Y., Du Y., Hao S., Wang Y., Ni T. Mitochondrial dysfunction in the regulation of aging and aging-related diseases. *Cell Commun. Signal.* 2025;23(1):290.
12. Yang J., Zhou R., Ma Z. Autophagy and energy metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019;1206:329–357.
13. Matilainen O., Quirós P.M., Auwerx J. Mitochondria and epigenetics — crosstalk in homeostasis and stress. *Trends Cell Biol.* 2017;27(6):453–463.
14. Icard P., Coquerel A., Wu Z., Gligorov J., Fuks D., Fournel L., Lincet H., Simula L. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells and tumors: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(12):6587.
15. Martínez-Reyes I., Chandel N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* 2020;11(1):102.
16. Yang Y., Gibson G.E. Succinylation links metabolism to protein functions. *Neurochem. Res.* 2019;44(10):2346–2359.
17. Chen H., Xu H., Potash S., Starkov A., Belousov V.V., Bilan D.S., Denton T.T., Gibson G.E. Mild metabolic perturbations alter succinylation of mitochondrial proteins. *J. Neurosci. Res.* 2017;95(11):2244–2252.
18. Hansen G.E., Gibson G.E. The α -ketoglutarate dehydrogenase complex as a hub of plasticity in neurodegeneration and regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(20):12403.
19. Brooks G.A. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biol.* 2020;35:101454.
20. Hussien R., Brooks G.A. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiol. Genomics.* 2011;43(5):255–264.
21. Glancy B., Kane D.A., Kavazis A.N., Goodwin M.L., Willis W.T., Gladden L.B. Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease. *J. Physiol.* 2021;599(3):863–888.
22. Brown T.P., Ganapathy V. Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon. *Pharmacol. Ther.* 2020;206:107451.
23. Zhang D., Tang Z., Huang H., et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature.* 2019;574(7779):575–580.
24. Varner E.L., Trefely S., Bartee D., von Krusenstiern E., Izzo L., Bekeova C., O'Connor R.S., Seifert E.L., Wellen K.E., Meier J.L., Snyder N.W. Quantification of lactoyl-CoA (lactyl-CoA) by liquid chromatography mass spectrometry in mammalian cells and tissues. *Open Biol.* 2020;10(9):200187.
25. Latham T., Mackay L., Sproul D., Karim M., Culley J., Harrison D.J., Hayward L., Langridge-Smith P., Gilbert N., Ramsahoye B.H. Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(11):4794–4803.
26. Amorim J.A., Coppotelli G., Rolo A.P., Palmeira C.M., Ross J.M., Sinclair D.A. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2022;18(4):243–258.
27. Virmani M.A., Cirulli M. The role of L-carnitine in mitochondria, prevention of metabolic inflexibility, and disease initiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(5):2717.

28. Liepinsh E., Makrecka-Kuka M., Makarova E., Volska K., Svalbe B., Sevostjanovs E., Grinberga S., Kuka J., Dambrova M. Decreased acylcarnitine content improves insulin sensitivity in experimental mice models of insulin resistance. *Pharmacol. Res.* 2016;113(Pt. B):788–795.
29. Chou H., Wen L.L., Chan C.M., Lin C.C., Liu H.W., You H.L., Wei W.L., Tsai C.Y., Lu C.C., Hsieh C.J., Lu F.J., Chen N.J. L-Carnitine reduces reactive oxygen species/endoplasmic reticulum stress and maintains mitochondrial function during autophagy-mediated cell apoptosis in perfluorooctanesulfonate-treated renal tubular cells. *Sci. Rep.* 2022;12(1):4673.
30. Kaupilla T.E.S., Kaupilla J.H.K., Larsson N.G. Mammalian mitochondria and aging: An update. *Cell Metab.* 2017;25(1):57–71.
31. Pesce V., Fracasso F., Cassano P., Lezza A.M., Cantatore P., Gadaleta M.N. Acetyl-L-carnitine supplementation to old rats partially reverts the age-related mitochondrial decay of soleus muscle by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha-dependent mitochondrial biogenesis. *Rejuvenation Res.* 2010;13(2–3):148–151.
32. Song Y., Li H., Shang R., Lu F., Gong Q., Liu J., Gong J., Li J., Wei C., Xu H. Carnitine acetyltransferase deficiency mediates mitochondrial dysfunction-induced cellular senescence. *Aging Cell.* 2023;22(11):e14000.
33. Goodpaster B.H., Sparks L.M. Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab.* 2017;25(5):1027–1036.
34. Houten S.M., Violante S., Ventura F.V., Wanders R.J. The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -oxidation and its genetic disorders. *Annu. Rev. Physiol.* 2016;78:23–44.
35. Sharma S., Aramburo A., Rafikov R., Sun X., Kumar S., Oishi P.E., Datar S.A., Raff G., Xoinis K., Kalkan G., Fratz S., Fineman J.R., Black S.M. L-carnitine preserves endothelial function in a lamb model of increased pulmonary blood flow. *Pediatr. Res.* 2013;74(1):39–47.
36. Звягина В.И., Шумаев К.Б., Бельских Э.С., Урясьев О.М., Ахмедова С.Р., Марсянова Ю.А., Шитикова А.М., Сучкова О.Н. Протективные эффекты L-аргина на митохондрии эпидидимиса крыс при гипергомоцистеинемии, вызванной длительной метиониновой нагрузкой. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2022;30(4):457–470.
37. Miguel-Carrasco J.L., Mate A., Monserrat M.T., Arias J.L., Aramburo O., Vázquez C.M. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2008;21(11):1231–1237.
38. Zvyagina V.I., Belskikh E.S. Comparative assessment of the functional activity of rat epididymal mitochondria in oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia and L-NAME administration. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(5):364–379.
39. Звягина В.И., Бельских Э.С. Карнитина хлорид снижает степень выраженности экспериментальной гипергомоцистеинемии и способствует утилизации лактата митохондриальной фракцией эпидидимиса крыс. *Биомед. хим.* 2021;67(4):338–346.
40. Sharma B., Schmidt L., Nguyen C., Kiernan S., Dexter-Meldrum J., Kuschner Z., Ellis S., Bhatia N.D., Agriantonis G., Whittington J., Twelker K. The effect of L-carnitine on critical illnesses such as traumatic brain injury (TBI), acute kidney injury (AKI), and hyperammonemia (HA). *Metabolites.* 2024;14(7):363.
41. Badaro R., Barbosa J. D.V., de Araujo Neto C.A., Machado B.A.S., Soares M.B.P., de Senna V., Taddeo M., de Araújo L.T., Durkee S., Donninger R., Judge K., Saiyed Z. A randomized clinical trial to evaluate the efficacy of L-carnitine L-tartrate to modulate the effects of SARS-CoV-2 infection. *Front. Nutr.* 2023;10:1134162.
42. Tama B., Fabara S.P., Zarrate D., Anas Sohail A. Effectiveness of propionyl-L-carnitine supplementation on exercise performance in intermittent claudication: A systematic review. *Cureus.* 2021;13(8):e17592.

Поступила в редакцию 03.12.2024

После доработки 22.08.2025

Принята в печать 08.11.2025

REVIEW

Signaling role of selected mitochondrial metabolites in the regulation of mitochondrial homeostasis

V.I. Zvyagina^{1,*} , A.M. Shitikova^{1,2} , M.M. Atroshchenko² , Yu.A. Marsyanova^{1,2} ,
E.S. Belskikh³ , D.O. Melnikov³ 

¹Department of Biological Chemistry, Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltnaya St., Ryazan, 390026, Russia;

²All-Russian Research Institute of Horse Breeding, 20 Divovo, Ryazan Region, 391105, Russia;

³Professor V.Ya. Garmash Department of Faculty Therapy, Ryazan State Medical University,
9 Vysokovoltnaya St., Ryazan, 390026, Russia

*e-mail: vizvyagina@yandex.ru

This review systematizes contemporary data on the signaling role of mitochondrial metabolites in regulating mitochondrial homeostasis, with an emphasis on their influence on cellular adaptation to stress factors, including age-related changes. Mitochondria function not only as energy sources but also as key sensors and regulators, mediating anterograde and retrograde signaling through metabolites such as citrate, succinate, lactate, and L-carnitine. Citrate and succinate

participate in epigenetic modifications, including protein acetylation and succinylation, thereby influencing gene expression and metabolic adaptation, with potential applications in the therapy of oncological and age-associated diseases. Lactate, traditionally regarded as a product of anaerobic metabolism, acts as a signaling molecule that modulates receptor cascades (GPR81), histone lactylation, and oxidative phosphorylation in mitochondria. L-Carnitine ensures metabolic flexibility by maintaining the acyl-CoA/CoA balance, removing toxic metabolites, and enhancing nitric oxide bioavailability, demonstrating its protective effects in models of hyperhomocysteinemia and NO deficiency. Understanding these mechanisms opens up prospects for the identification of biomarkers of mitochondrial dysfunction and the development of therapeutic strategies aimed at restoring homeostasis in the context of aging, metabolic disorders, and gerontological syndromes.

Keywords: mitochondria, citrate, succinate, lactate, L-carnitine, NO, age-related dysfunction

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 20-16-00101-P) and by an intra-university grant from Ryazan State Medical University, agreement no. 1A/25 dated April 9, 2025, for the implementation of research work on the topic: “Metabolic markers of impaired adaptation to hypoxia in COPD: The role of hyperhomocysteinemia and carnitine deficiency.”

Сведения об авторах

Звягина Валентина Ивановна — докт. мед. наук, доц. кафедры биологической химии РязГМУ Минздрава России. Тел.: 8-4912-97-18-98; e-mail: vizvyagina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2800-5789>

Шитикова Анна Михайловна — канд. биол. наук, доц. кафедры биологической химии РязГМУ Минздрава России; ст. науч. сотр. лаборатории криобиологии ВНИИ коневодства. Тел.: 8-4912-97-18-98; e-mail: anyakudlaeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4004-9058>

Атрощенко Михаил Михайлович — канд. биол. наук, зав. лабораторией криобиологии, вед. науч. сотр. лаборатории криобиологии ВНИИ коневодства. Тел.: 8-4912-24-02-65; e-mail: atomiks-77@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6023-0332>

Марсянова Юлия Александровна — ассистент кафедры биологической химии РязГМУ Минздрава России; науч. сотр. лаборатории криобиологии ВНИИ коневодства. Тел.: 8-4912-97-18-98; e-mail: yuliyamarsyanova@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4948-4504>

Бельских Эдуард Сергеевич — канд. мед. наук, доц. кафедры факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша РязГМУ Минздрава России. Тел.: 8-4912-97-18-98; e-mail: ed.bels@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1803-0542>

Мельников Денис Олегович — студент лечебного факультета РязГМУ Минздрава России. Тел.: 8-4912-97-18-98; e-mail: melnikovdenis200219@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-3190-0954>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 574.58:[582.263]

Представители клады *Chlorella* в техногенном озере Отстойник (Самарская область, Россия) в период самовосстановления

Е.С. Кривина

Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина,
Пушкинский научный центр биологических исследований, Российская академия наук,
Россия, 142290, Московская область, г. Пушкино, проспект Науки, д. 5
e-mail: pepelisa@yandex.ru

Приведены результаты исследования видового разнообразия представителей клады *Chlorella* в озере Отстойник (город Тольятти, Самарская область). Данный водоем до 1996 г. использовался для утилизации отходов азотно-тукового производства, но в настоящее время находится на этапе самовосстановления. В ходе работы было исследовано 15 штаммов микроводорослей с *Chlorella*-подобной морфологией. По итогам молекулярно-генетического анализа с использованием внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 было установлено, что только три штамма являлись истинными представителями рода *Chlorella*. Также были обнаружены микроводоросли из родов *Brachionococcus*, *Lobosphaeropsis*, *Micractinium*, *Meyerella*. Кроме того, два штамма принадлежали к видам, которые пока формально относят к роду *Chlorella*, но их действительный таксономический статус нуждается в уточнении. Данное исследование еще раз наглядно показало, что валидная идентификация *Chlorella*-подобных микроводорослей невозможна с использованием только методов световой микроскопии. Для исследования истинного видового богатства обязательно должны быть задействованы методы молекулярно-генетического анализа.

Ключевые слова: микроводоросли, криптическое разнообразие, альгомониторинг, культуральный подход, фитопланктон, ITS1–5.8S–ITS2

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-1

Введение

В настоящее время в свете нарастающего экологического кризиса и дефицита природных ресурсов мониторинг, восстановление и сохранение экосистем урбанизированных территорий становятся все более актуальными. Одной из проблем городских ландшафтов является наличие на их территории техногенных водоемов, подвергавшихся промышленной эксплуатации (озера-отстойники и шламонакопители). С течением времени они перестают быть необходимы предприятиям, и возникает вопрос об очистке и восстановлении таких водоемов. При этом, отмечается недостаток данных о том, как трансформируются их экосистемы после изменения интенсивности и типа антропогенного воздействия (с промышленного на рекреационный и/или аграрный).

Фитопланктон является чутким индикатором состояния окружающей среды, поэтому альгомониторинг широко используется для отслеживания актуального состояния различных водных экоси-

стем. Обычно для определения качественного состава и показателей количественного развития водорослей используются концентрированные пробы, которые были отфильтрованы, например, с помощью насоса Комовского и содержат в своем составе сильные фиксаторы (например, формалин). Однако в процессе такой пробоподготовки некоторые морфологические признаки (щетинки, колонии, слизь) деформируются или утрачиваются. Идентификация видов водорослей и подсчет клеток проводятся с помощью световой микроскопии при увеличении, как правило, не более $\times 600$, поэтому виды, имеющие близкие морфотипы, остаются неучтенными. Все это затрудняет изучение истинного видового разнообразия. Между тем точные данные о видовом составе и структуре альгофлоры весьма полезны при проведении анализа общего состояния биогеоценозов малых урбанизированных водоемов, оценки степени их деградации, а также при разработке программ по их восстановлению [1–3].

Представители клады *Chlorella* ввиду простой морфологии характеризуются высоким криптическим разнообразием, и при альгомониторинге с помощью световой микроскопии оценить истинное количество видов этой клады фактически невозможно. Решить данную проблему позволяет использование, например, культурального подхода. Полученные в ходе работы альгологически чистые штаммы представляют не только научный, но и практический интерес. В последние годы отмечается устойчивая тенденция роста внимания к экологически чистым биотехнологическим разработкам. Использование водорослей для очистки загрязненных вод считается одним из перспективных методов, дополнительным преимуществом которого является возможность использования полученной биомассы для производства биотоплива, удобрений и т. д. [4, 5]. Штаммы, полученные из техногенных водоемов или сточных вод, в этом плане являются наиболее привлекательными, поскольку уже адаптированы к выживанию в загрязненных водах. Подобные исследования, как правило, касаются водных объектов в период активной эксплуатации или уже после рекультивации. Между тем, видовое разнообразие фитопланктона в период самовосстановления до сих пор практически не изучено. Часто работы посвящены анализу видового разнообразия всех таксономических групп водорослей. В связи с крайне скудной морфологией группа *Chlorella*-подобных водорослей в таких исследованиях представлена крайне ограниченным количеством штаммов, что не позволяет оценить истинное видовое богатство видов данной группы [6–8]. Кроме того, часто исследования проводятся только с помощью методов световой микроскопии, без выделения штаммов, что, как уже отмечалось ранее, не позволяет получить достоверные сведения о видовой принадлежности *Chlorella*-подобных водорослей [9, 10].

Целью данной работы является изучение криптического разнообразия представителей *Chlorella*-клады в техногенном озере Отстойник на этапе самовосстановления водоема спустя 20 лет после прекращения промышленной эксплуатации.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами данного исследования стали штаммы зеленых микроводорослей, выделенные из озера Отстойник (53.5018 с.ш., 49.4940 в.д.), малого техногенного водоема из системы Васильевские озера (город Тольятти, Самарская область). В данный водоем до 1996 г. активно поступали жидкие отходы азотно-тукового производства ОАО «КуйбышевАзот» [3]. Затем его эксплуатация была прекращена, и в настоящее время водоем находится в процессе самовосстановления. 12 штаммов были изолированы непосредственно из пелагической части водоема. Три

штамма были выделены из инфузорий *Paramecia*, выловленных в прибрежных зарослях макрофитов.

Изолирование и культивирование штаммов. Для получения культур свободноживущих штаммов каплю воды из исследуемого озера наносили на твердую среду BG-11 с азотом (1%-ный агар, pH = 7,2) и далее многократно пересевали отдельные колонии до получения альгологически чистых культур. Для выделения эндосимбионтов *Paramecia* клетки инфузории промывали последовательно в 6 каплях 0,5%-ного стрептомицина и переносили в жидкую среду BG-11. После голодания и переваривания пищи в течение 72 ч инфузорию снова обрабатывали 0,5%-ным стрептомицином, а затем переносили на среду BG-11 с витаминами и пептоном (2%-ный агар, pH = 7,2). Затем клетку инфузории прокалывали стерильной иглой [11].

Все изоляты культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура +20°C, свет 60–75 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, фотопериод 12:12 ч). Сроки культивирования штаммов перед последующими этапами анализа варьировали от 4 нед. до 6 мес.

Световая микроскопия. Морфологию и жизненные циклы исследуемых штаммов изучали методом световой микроскопии с помощью микроскопа Leica DM750 (Германия). Результаты наблюдений документированы фотографиями, снятыми с помощью цветной цифровой камеры Leica Flexacam C3 (Германия). Сроки наблюдения составляли от 1 нед. до 6 мес. Для морфометрических измерений использовали программу Leica Application Suite X (Германия). Для сравнения размеров измеряли 200 клеток каждого штамма. За основу в данной работе выбрана система микроводорослей, принятая в международной электронной базе данных Algae Base [12].

Выделение тотальной ДНК, амплификация, очистка и секвенирование ампликонов. Для молекулярно-генетической идентификации штаммов в качестве ДНК-баркода использовали внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Суммарную ДНК из штаммов выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS («Евроген», Россия). Условия и праймеры для амплификации указаны в статье Джонсон с соавт. [13]: ITS-AF 5'-CGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3', ITS-BR 5'-CATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3' (условия амплификации: 95°C, 30 с; 95°C (30 с), 57,6°C (30 с), 72°C (1 мин), 35 циклов; 72°C, 10 мин). Детекцию целевых продуктов полимеразной цепной реакции проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Очистка ампликонов из геля проводилась с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Секвенирование проводилось на базе коммерческой компании «Евроген» (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для молекулярно-генетической идентификации штаммов микроводорослей был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей ITS1–ITS2 по алгоритму BLASTn в GenBank NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Отбор последовательностей осуществляли, исходя из критериев максимального родства (сходство $\geq 95\%$), качества прочтения (без вырожденных и неизвестных нуклеотидов), длины прочтения и принадлежности к типовым видам и коллекционным аутентичным штаммам. Множественное выравнивание было выполнено в программе 4SALE [14] с учетом вторичной структуры. При аннотации спейсера ITS1 опирались на общие рекомендации Колеман [15] и другие ранее опубликованные работы [6, 16–19]. Аннотацию спейсера ITS2 осуществляли с использованием сервиса ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>), а также опираясь на вышеперечисленные работы. Фолдинг внутренних спейсеров проводили с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) по принципу минимальной энергии. Выбор нуклеотидных замен для построения филогенетического дерева осуществляли с помощью программы IQ-TREE v. 2.2 [20], ориентируясь на минимальное значение критерия BIC (Bayesian information criterion). Оценка топологии ветвей с помощью теста SH-aLRT (тест приближенного отношения правдоподобия с непараметрической коррекцией на базе алгоритма Шимодайры–Хасегавы) была реализована в блоке построения филогенетического дерева uGENE. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей с помощью метода максимального правдоподобия (ML – maximum likelihood) осуществляли в программе IQ-TREE v. 2.2, реконструкцию с использованием метода Байеса – с использованием программного пакета BEAST 2 v. 2.7.5 [21]. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT-поддержки (SH-aLRT – Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test), бутстреп-поддержки ML (BP – bootstrap percentages) и апостериорных вероятностей BI (PP – posterior probabilities). Различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических различий, мерой которых являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выравненных последовательностей, вычисленный в программе MEGA 11 с помощью 2-параметрической модели Кимуры [22]. Сравнение различий вторичных структур ITS1 и ITS2 между штаммами и поиск компенсаторных замен (CBCs – compensatory base changes) осуществляли между всеми штаммами выборки в программе 4SALE. Более подробно методы описаны в статье Кривина с соавт. [23].

Результаты и обсуждение

В данной работе представлены результаты изучения 15 штаммов, которые, согласно филогенетическому анализу с использованием фрагмента ITS1–5.8S–ITS2, являлись представителями клады *Chlorella* (рис. 1).

Штаммы О-31 (рис. 2А) и О-2Par (рис. 2Б) имели классический *Chlorella*-подобный морфотип (шаровидные или овальные клетки, одиночные, не продуцирующие щетинки, чашевидный хлоропласт с одним пиреноидом) и кластеризовались с представителями собственно *C. vulgaris* (SH-aLRT – 100%, BP – 100%, PP – 1,00). Генетические дистанции по фрагменту ITS1–5.8S–ITS2 с аутентичным штаммом *C. vulgaris* SAG 211-11b составляли 0–0,2%, что в рамках клады *Chlorella* соответствует внутривидовому уровню. Для сравнения межвидовые дистанции внутри рода *Micractinium* составляли не менее 3,5% (между *M. variabilis* и *M. singularis*). Анализ вторичных структур ITS1 и ITS2 данных штаммов и аутентичного штамма SAG 211-11b не выявил CBCs или существенных различий в строении шпилек. Как известно, представители *C. vulgaris* обладают способностью вступать во временные симбиотические отношения с беспозвоночными, хотя большинство штаммов является все же свободноживущими организмами [6, 24, 25]. Штамм О-31 относится к свободноживущим организмам, тогда как штамм О-2Par – факультативный эндосимбионт одноклеточной инфузории *Paramecium bursaria*. Таким образом, штаммы О-31 и О-2Par были идентифицированы как представители *C. vulgaris*.

У штамма О-12 (рис. 2В), изолированного из пелагической части водоема, в культуре наряду с одиночными клетками были встречены *Dictyosphaerium*-подобные колонии (овальные и шаровидные клетки соединены гиалиновыми тяжами). Данный штамм кластеризовался с аутентичным штаммом *C. pituita* ACOI 311 (SH-aLRT – 98%, BP – 100%, PP – 1,00) [6]. В отличие от описания аутентичного штамма ACOI 311 в культуре мы отмечали максимум 4-клеточные колонии, что может быть связано с культивированием на агаризованной среде. Уровень генетических различий между штаммами О-12 и ACOI 311 соответствовал внутривидовому (0,2%). CBCs и значимые различия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 также отсутствовали. В связи с этим можно сказать, что штамм О-12 относится к виду *C. pituita*.

Штамм О-15Par2 (рис. 2Г), обладающий морфологией типичного «маленького зеленого шарика», группировался с аутентичным штаммом *C. variabilis* SAG 211-6 (SH-aLRT – 100%, BP – 100%, PP – 1,00), при этом генетические дистанции не превышали 0,2% (внутривидовой уровень). Морфология исследуемого штамма соответствовала типовому диагнозу вида. CBCs и различия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 не были обнаруже-

ны. Представители вида *C. variabilis* являются исключительно эндосимбионтами. Штамм O-15Par2 также был изолирован из инфузории *Paramecium bursaria*, и, как показала практика, не может поддерживаться на стандартных средах без внесения пептона и витаминов [26]. Таким образом, штамм O-15Par2 был идентифицирован как представитель *C. variabilis*.

Характерная особенность штамма O-34 (рис. 2Д) — наличие лопастного хлоропласта, что в рамках клады *Chlorella* свойственно только представителям *Lobosphaeropsis lobophora*. Филогенетический анализ подтвердил предположения о видовой принадлежности исследуемого штамма,

выдвинутые на основе результатов световой микроскопии. Штамм O-34 кластеризовался с аутентичным штаммом *L. lobophora* SAG 37.88 с максимальными статистическими поддержками. Генетические различия составили 0%, соответственно, различия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 исследуемого штамма и SAG 37.88 отсутствовали. Традиционным местом обитания *L. lobophora* считаются почвы [27]. Штамм O-34 был изолирован из пелагиали техногенного озера. Однако, поскольку водоем мелководный, полностью исключать занос из почвы нельзя. Вообще, почва не является типичной средой обитания для представителей *Chlorella*-клады.

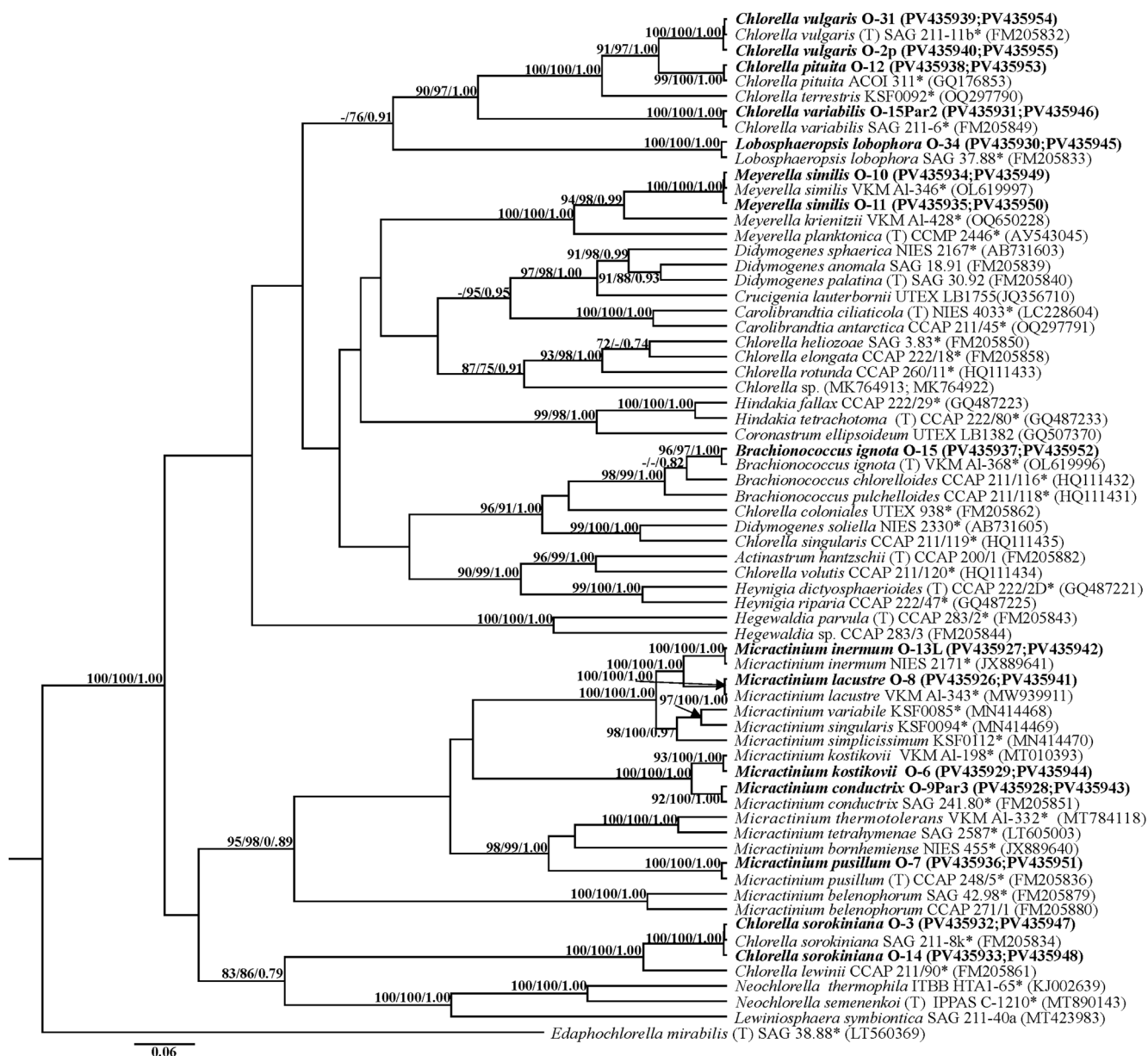


Рис. 1. Укорененное филогенетическое дерево клады *Chlorella*, построенное методом Байеса (BI), на основе последовательностей генов внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 с учетом вторичной структуры (1086 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT (вероятность теста приближенного отношения правдоподобия с непараметрической коррекцией на базе алгоритма Шимодайры–Хасегавы)/BP (бутстреп-вероятность)/ PP (апостериорная вероятность). Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0,7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2e + I + G4. Обозначения: жирным шрифтом выделены исследуемые штаммы, исследуемые в рамках, * — аутентичные штаммы; (T) — типовой вид.

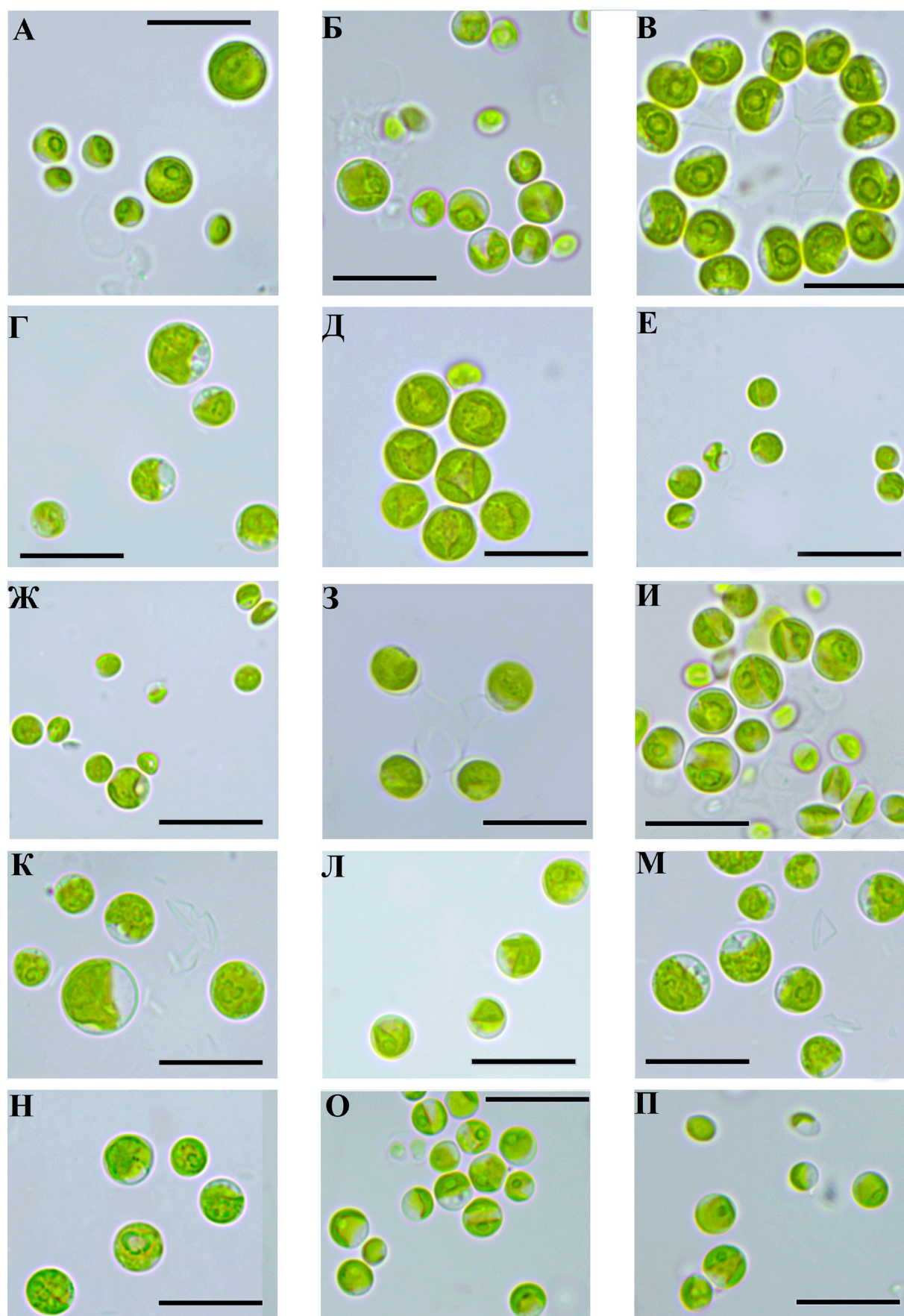


Рис. 2. А – штамм *Chlorella vulgaris* O-31; Б – штамм *C. vulgaris* O-2Par; В – штамм *C. pituita* O-12; Г – штамм *C. variabilis* O-15Par2; Д – штамм *Lobosphaeropsis lobophora* O-34; Е – штамм *Meyerella similis* O-10; Ж – штамм *M. similis* O-11; З – штамм *Brachionococcus ignota* O-15; И – штамм *Micractinium inermum* O-13L; К – штамм *M. lacustre* O-8; Л – штамм *M. kostikovii* O-6; М – штамм *M. conductrix* O-9Par3; Н – штамм *M. pusillum* O-7; О – штамм *C. sorokiniana* O-3; П – штамм *C. sorokiniana* O-14. Шкала – 10 мкм.

Помимо штамма *L. lobophora* SAG 37.88, изолированного В.М. Андреевой из почвы смешанного леса, почвенными обитателями являются *C. lewinii*, *C. volutis* и *M. krienitzii*. Однако штаммы данных видов были выделены либо из почвы вблизи озер в случае *C. Lewinii* или *C. volutis* [28], либо из криогенной трещины, где высокая влажность почвы, как в случае *M. krienitzii* [29]. Информация о том, был ли какой-нибудь водоем вблизи места изоляции штамма SAG 37.88, отсутствует. Тем не менее, обобщая все вышесказанное, не вызывает сомнений, что штамм О-34 относится к виду *L. lobophora*.

Отличительной чертой штаммов О-10 (рис. 2Е) и О-11 (рис. 2Ж) было отсутствие пиреноида, что на этапе предварительной морфологической идентификации позволило предположить их родство с представителями таких родов, как *Meyerella*, *Mychonastes* и *Edaphochloris*. Согласно результатам филогенетического анализа фрагмента ITS1–5.8S–ITS2, они кластеризовались с аутентичным штаммом *Meyerella similis* VKM AI-346 (SH-aLRT – 98%, BP – 100%, PP – 1,00). Генетические дистанции между исследуемыми штаммами составляли менее 0,1% (внутривидовой уровень), CBCs отсутствовали. Пресноводный водоем – типичная среда обитания для представителей *M. similis*. При этом оба исследуемых штамма являлись свободноживущими организмами, хотя среди представителей *M. similis* встречаются и факультативные эндосимбионты [28]. Таким образом, штаммы О-10 и О-11 были идентифицированы как *M. similis*.

Еще одним штаммом, который изначально демонстрировал *Dictyosphaerium*-подобный морфотип, был штамм О-15 (рис. 23) Однако он принадлежал к виду *Brachionococcus ignota*, поскольку кластеризовался с аутентичным штаммом этого вида VKM AI-368 (SH-aLRT – 93%, BP – 99%, PP – 1,00), генетические дистанции между данными штаммами соответствовали внутривидовому уровню (0,4%), а CBCs и иные различия во вторичных структурах ITS1 и ITS2 отсутствовали. Кроме того, как и другие представители рода *Brachionococcus*, штамм О-15 является свободноживущим организмом.

Хотя штаммы О-13L (рис. 2И), О-8 (рис. 2К), О-6 (рис. 2Л), О-9Par3 (рис. 2М) и О-7 (рис. 2Н) имели типичную *Chlorella*-подобную морфологию и не продуцировали шетинки в культуре, филогенетический анализ показал, что они относятся к роду *Micractinium*, представители которого характеризуются морфологической неоднородностью. Исследуемый штамм О-13L кластеризовался с аутентичным штаммом *M. inermum* NIES 2171. Штамм О-8 вошел в одну группу с аутентичным штаммом *M. lacustre* VKM AI-343, штамм О-6 – с аутентичным штаммом *M. kostikovii* VKM AI-198, штамм О-9Par3 – с ау-

тентичным *M. conductrix* SAG 241.80. Штамм О-7 кластеризовался с аутентичным штаммом *M. pusillum*. Во всех случаях статистические поддержки были максимальными. Примечательно, что, в отличие от остальных видов в дикой природе, представители *M. pusillum* способны продуцировать шетинки и формировать колонии, однако при культивировании в отсутствие хищников эти морфологические признаки утрачиваются [29]. Генетические дистанции во всех случаях соответствовали внутривидовому уровню: между О-13L и *M. inermum* NIES 2171 – 0%; между О-8 и *M. lacustre* VKM AI-343 – 0%; между О-6 и *M. kostikovii* VKM AI-198 – 0,2%; между О-9Par3 и *M. conductrix* SAG 241.8 – 0,4%; между штаммом О-7 и *M. pusillum* – 0,4%. CBCs и значимые отличия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 не обнаружены. Все штаммы, за исключением О-9Par3, были свободноживущими обитателями планктона. Штамм О-9Par3, как и другие представители *M. conductrix*, является облигатным эндосимбионтом инфузорий, так что не мог существовать на стандартных средах [6, 24, 26]. Таким образом, штамм О-13L принадлежал к виду *M. inermum*, штамм О-8 – к *M. lacustre*, штамм О-6 – к *M. kostikovii*, штамм О-9Par3 – к *M. conductrix*, штамм О-7 – к *M. pusillum*.

Штаммы О-3 (рис. 2О) и О-14 (рис. 2П) кластеризовались с максимальной статистической поддержкой с аутентичным штаммом *C. sorokiniana* SAG 211-8k. Отличий от классического морфологического описания этого вида не было обнаружено, а генетические дистанции составили 0%. Исследуемые штаммы, как и другие представители *C. sorokiniana*, были свободноживущими обитателями пресноводных водоемов [8, 27]. На основании вышесказанного мы заключили, что штаммы О-3 и О-14 являются представителями *C. sorokiniana*.

Заключение

Таким образом, с помощью культурального подхода в составе фитопланктона техногенного озера Отстойник, находящегося в процессе самовосстановления после прекращения промышленной эксплуатации, были обнаружены 15 штаммов, относящихся к 12 различным видам клады *Chlorella*. При этом только три штамма являлись истинными представителями рода *Chlorella*. Один штамм относился к роду *Brachionococcus*, один штамм – к роду *Lobosphaeropsis*, шесть штаммов – к роду *Micractinium*, два штамма – к роду *Meyerella*, а два штамма – к видам *C. sorokiniana* и *C. variabilis*. Последние два вида, согласно результатам молекулярно-генетического анализа, на самом деле являются представителями новых родов в рамках клады *Chlorella*, которые пока еще не валидированы [24, 25]. Хотелось бы отметить, что при осуществлении альгомониторинга в 2014 г.

с помощью световой микроскопии в составе фитопланктона данного водоема из «маленьких зеленых шариков» были зафиксированы один вид, отнесенный к роду *Chlorella*, один вид — к роду *Micractinium* и один вид, обладающий *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, на основании чего был причислен к роду *Dictyosphaerium* (клада *Parachlorella*), хотя с определенной долей вероятности это мог быть представитель клады *Chlorella*, например, из рода *Brachionococcus*, что еще раз наглядно демонстрирует необходимость привлечения молекулярных методов для изучения истинного видового богатства фитопланктона. При этом в период активной эксплуатации (до 1996 г.), когда в водоем поступали отходы азотно-тукового производства, водоросли с *Micractinium*-подобным морфотипом не были обнаружены в принципе. Примечательно также, что в период активной техногенной нагрузки общая численность «маленьких зеленых шариков» была крайне низкой и не превышала 96 тыс. кл./л. После прекращения сбросов в 2014 г. их численность существенно возросла и в июне, когда традиционно отмечается пик развития зеленых водорослей в малых водоемах средней полосы России, составляла уже 448 тыс. кл./л [3]. В целом, видовое богатство обнаруженных с помощью молекулярно-генетических методов *Chlorella*-подобных водорослей было весьма высоким. В ходе исследования были обнаружены не только свободноживущие «маленькие зеленые шарики», но и эндосимбионты, в том числе облигатные. Это свидетельствует об усложнении структуры фитопланктона по мере восстановления экосистемы озера и повышения ее устойчивости [30]. При этом общее видовое богатство всех обнаруженных представителей *Chlorella*-клады было выше, чем ранее было показано для сточных вод и иных антропогенно трансформированных водоемов [6–8]. Хотя это является позитивным признаком, не стоит забывать, что подобная ситуация может отчасти быть связана с изначально крайне ограниченным количеством *Chlorella*-подобных штаммов, взятых в анализ в указанных исследованиях. Значительная часть изученных штаммов, за исключением эндосимбионтов, которым необходимо создавать особые условия культивирования, являются перспективными кандидатами для разработки препаратов,

применяемых при биоремедиации водоемов, поскольку изначально адаптированы к выживанию в стрессовых условиях антропогенно трансформированного водоема [8].

Валидная идентификация сложной в морфологическом плане группы *Chlorella*-подобных микроводорослей невозможна с использованием только методов световой микроскопии, так как приводит к занижению фактического биоразнообразия микроводорослей в экосистемах водоемов. Это в свою очередь вносит искажения в результаты при проведении анализа общего состояния биогеоценозов малых урбанизированных водоемов, оценки степени их деградации, а также при разработке программ по их восстановлению. В связи с этим необходимо привлекать современные молекулярно-генетические методы. Главный молекулярно-филогенетический маркер для эукариотических организмов — ядерный ген 18S рРНК — достаточно консервативен и не позволяет успешно разделять близкородственные виды «маленьких зеленых шариков». Гены *rbcL* и *tufA* на данном этапе исследований прочитаны далеко не для всех представителей клады *Chlorella* [24]. В связи с этим, при наличии альгологически чистой культуры наиболее надежным и эффективным методом идентификации может стать амплификация участка ITS1–5.8S–ITS2 или только ITS2 с последующим секвенированием по Сэнгеру. В случае работы непосредственно с природными образцами, чтобы избежать длительного этапа очистки и получения отдельных штаммов, можно использовать амплификацию тех же ДНК-баркодов с последующим высокопроизводительным секвенированием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание №FMRM-2022-2019, Росрид № 122040100065-3). Также автор выражает признательность Малышевой А.А. и сотрудникам Федерального государственного бюджетного учреждения «Средневолжрыбвод» за помощь в отборе проб и всестороннюю поддержку. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Babanazarova O.V. Northern expansion of *Cylindropermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) observed in shallow highly eutrophic Lake Nero (Russia). *Int. J. Algae*. 2015;17(2):131–141.
2. Korneva L.G. Taxonomic composition and ecology of green algae (Chlorophyta and Streptophyta) in Shallow Weakly mineralized forest lakes. *Int. J. Algae*. 2012;14(4):331–347.
3. Кривина Е.С., Тарасова Н.Г. Изменения таксономической структуры фитопланктона малых водоемов после прекращения техногенной эксплуатации. *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. естеств. науки*. 2018;160(2):292–307.

4. Blasio M., Balzano S. Fatty acids derivatives from eukaryotic microalgae, pathways and potential applications. *Front. Microbiol.* 2021;12:718933.
5. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Starikov A.Y., Voronkov A.S., Medvedeva A.S., Krivova Z.V., Pakholkova M.S., Bachin D.V., Bedbenov V.S., Gabrielyan D.A., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Los D.A. Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strains from the IPPAS culture collection. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020;56(7):794–808.
6. Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 2011;11(2):293–312.
7. Karpagam R., Preeti R., Jawahar R.K., Saranya S., Ashokkumar B., Varalakshmi P. Fatty acid biosynthesis from a new isolate *Meyerella* sp. N4: molecular characterization, nutrient starvation, and fatty acid profiling for lipid enhancement. *Energ. Fuel.* 2015;29(1):143–149.
8. Suarez-Montes D., Borrell Y.J., Gonzalez J.M., Rico J.M. Isolation and identification of microalgal strains with potential as carotenoids producers from a municipal solid waste landfill. *Sci. Total Environ.* 2022;802:149755.
9. Копырина Л.И. Структура и видовой состав водорослей техногенных водоемов (бассейн р. Анабар, Северо-Западная Якутия). *Совр. пробл. науки образов.* 2016;4:207–213.
10. Мустафаева М.И., Файзиева Ф.А. Преобладающие виды водорослей биологических прудов очистных сооружений. *Нац. ассоц. уч.* 2016;(4–1(20)):100–101.
11. Spanner C., Darienko T., Biehler T., Sonntag B., Pröschold, T. Endosymbiotic green algae in *Paramecium bursaria*: a new isolation method and a simple diagnostic PCR approach for the identification. *Diversity*, 2020;12(6):240.
12. Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. [Электронный ресурс]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2025. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения: 16.07.2025).
13. Johnson J.L., Fawley M.W., Fawley K.P. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. *Phycologia*. 2007;46(2):214–229.
14. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 4SALE: a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinform.* 2006;7(1):498.
15. Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 2015;31(3):157–163.
16. Bock C., Pröschold T., Krienitz L. Two new *Dicetyosphaerium*-morphotype lineages of the Chlorellaceae (Trebouxiophyceae): *Heynigia* gen. nov. and *Hindakia* gen. nov. *Eur. J. Phycol.* 2010;45(3):267–277.
17. Hoshina R., Nakada T. *Carolibrandtia* nom. nov. as a replacement name for *Brandtia* Hoshina (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2018;66(1):82–83.
18. Krivina E.S., Sinetova M., Savchenko T., Degtyayev E., Tebina E., Temraleeva, A. *Micractinium lacustre* and *M. thermotolerans* spp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): taxonomy, temperature-dependent growth, photosynthetic characteristics and fatty acid composition. *Algal Res.* 2023a;71(2):103042.
19. Krivina E.S., Boldina O.N., Bukin Y.S., Bykova S.V., Temraleeva, A.D. Species delimitation polyphasic approach reveals *Meyerella similis* sp. nov.: a new species of ‘small green balls’ within the Chlorella-clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Org. Divers. Evol.* 2023;23(1):25–40.
20. Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor, O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 2020;37(5):1530–1534.
21. Barido-Sottani J., Boskova V., Du Plessis L., Kuhnert D., Magnus C., Mitov V., Muller N.F., Pecerska J., Rasmussen D.A., Zhan, C., Rasmussen D.A., Zhang C., Drummond A.J., Heath T.A., Pybus O.G., Vaughan T.G., Stadler T. Taming the BEAST—A community teaching material resource for BEAST2. *Syst. Biol.* 2018;67(1):170–174.
22. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(7):3022–3027.
23. Krivina E., Portnov A., Temraleeva A. A description of *Aliichlorella ignota* gen. et sp. nov. and a comparison of the efficiency of species delimitation methods in the Chlorella-clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 2024;72(3):180–190.
24. Krivina E.S., Temraleeva A.D. Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (Chlorophyta). *Microbiology.* 2020;89(6):720–732.
25. Chae H., Kim E.J., Kim H.S., Choi H.-G., Kim S., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of two Antarctic strains within the genera *Carolibrandtia* and *Chlorella* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Algae.* 2023;38(4):241–252.
26. Pröschold T., Darienko T., Silva P. C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of “Zoochlorella” revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 2011;13(2):350–364.
27. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука; 1998. 351 с.
28. Krivina E.S., Savchenko T.V., Tebina E.M., Shatilovich A.V., Temraleeva A.D. Morphology, phylogeny and fatty acid profiles of *Meyerella similis* from freshwater ponds and *Meyerella krienitzii* sp. nov. from soil (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 2023;35(5):2295–2307.
29. Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist.* 2006;157(3):315–333.
30. Романенко В.Д. *Основы гидроэкологии*. К.: Генеза; 2004. 664 с.

Поступила в редакцию 06.04.2025

После доработки 17.07.2025

Принята в печать 01.09.2025

RESEARCH ARTICLE

Representatives of the genus *Chlorella* in a technogenic lake Otstoynik (Samara region, Russia) during the self-healing period

E.S. Krivina 

All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences,
5 Institutskaya St., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia
e-mail: pepelisa@yandex.ru

This article presents the results of a study of the species diversity of representatives of the clade *Chlorella* in the lake Otstoynik (Tolyatti, Samara region). This reservoir was used until 1996 for the disposal of nitrogen-tuck production waste but is currently at the stage of self-healing. In the course of the work, 15 strains of microalgae with *Chlorella*-like morphology were studied. Based on the results of molecular genetic analysis using the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, it was found that only 3 strains were true representatives of the genus *Chlorella*. Microalgae from the genera *Brachionococcus*, *Lobosphaeropsis*, *Micractinium*, and *Meyerella* were also found. In addition, 2 strains belonged to species that are still formally classified as *Chlorella*, but their actual taxonomic status needs to be clarified. This study has once again clearly shown that valid identification of *Chlorella*-like microalgae is not possible using only light microscopy methods. Methods of molecular genetic analysis must be used to study the true species' richness.

Keywords: *microalgae, cryptic diversity, algomonitoring, cultural approach, phytoplankton, ITS1–5.8S–ITS2*

Funding: The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment no. FMRM-2022-2019, Rosrid no. 122040100065-3). The author also expresses gratitude to Malysheva A.A. and the staff of the FSBI “Srednevolzhrybvod” for their assistance in sampling and comprehensive support.

Сведения об авторе

Кривина Елена Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. отдела Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Тел.: 8-4967-73-86-20; e-mail: pepelisa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0849-5832>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 616.348-002:615.244:616-092.9

Морфофункциональная характеристика модели острого умеренного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей

Н.А. Золотова¹ , М.В. Кириллова¹ , И.С. Цветков¹ , Д.Ш. Джалилова¹ ,
Л.В. Озерецкая^{1, *} , М.Т. Добрынина^{1, 2} , О.В. Макарова^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына,
Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Россия, 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

*e-mail: lozloz.o@yandex.ru

Язвенный колит — социально значимое заболевание, но его этиология не ясна. Наиболее широко используемой экспериментальной моделью является колит, индуцированный декстрансульфатом натрия. Целью настоящей работы стала оценка морфофункциональных и молекулярно-биологических изменений ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов при остром колите, индуцированном 1%-ным раствором декстрансульфата натрия у самцов мышей C57BL/6. При индукции колита в ободочной кишке развивался язвенно-воспалительный процесс умеренной тяжести, в брыжеечных лимфатических узлах наблюдались гиперплазия коркового вещества, плазматизация мозговых тяжей и макрофагальная реакция в синусах. В ободочной кишке были выявлены воспалительная инфильтрация, повышение содержания макрофагов, снижение объемной доли бокаловидных клеток и содержания в них нейтральных муцинов, повышение содержания эндокринных клеток, увеличение экспрессии *Cldn4*, *Cldn7*, *Bax* и *Bcl2*. Также наблюдались количественные изменения состава микробиома кишечника.

Ключевые слова: язвенный колит, экспериментальный колит, декстрансульфат натрия, микрофлора, биологическая модель, воспаление

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CgA — хромогранин А;
FDR — частота ложных обнаружений, False Discovery Rate;
М — молекулярная масса;
qPCR-RT — количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction);
БК — бокаловидные клетки;
БЛУ — брыжеечные лимфатические узлы;
ДСН — декстрансульфат натрия;
ПЦР — полимеразная цепная реакция;
рРНК — рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
СПСО — собственная пластинка слизистой оболочки;
ШИК — реакция с Шифф-йодной кислотой для выявления нейтральных муцинов;
ЯК — язвенный колит.

Введение

Язвенный колит (ЯК) — это хроническое рецидивирующее заболевание толстой кишки. Характеризуется непрерывным воспалением слизистой оболочки, начинающимся с прямой кишки и распространяющимся в проксимальном направлении. В России распространенность ЯК составляет 20 случаев на 100 тысяч населения [1]. При этом заболеваемость ЯК во всем мире продолжает расти [2]. Этиология ЯК не установлена, предполагается роль множества факторов: наследственность, «западная диета», дисбиоз кишечника, стрессы и т.д. В связи с неясной этиологией существующие методы диагностики и лечения недостаточно эффективны [2, 3].

Изучение этиологии и патогенеза на клиническом материале затруднено, а разработка новых методов лечения требует проведения доклинических исследований. Поэтому был разработан ряд экспериментальных моделей ЯК. Наиболее широ-

ко используемой и адекватной болезни человека моделью является колит, индуцируемый декстран-сульфатом натрия (ДСН) [4, 5]. В этой модели колит индуцируют заменой питьевой воды мышам на 1–5%-ный раствор ДСН на 4–9 сут. Терапия, эффективная при ЯК, вызывает сходный эффект при ДСН-индуцированном колите у мышей, что позволяет использовать данную модель для разработки и оценки эффективности новых лекарственных средств [6]. Модель технически легко выполняема, обладает высокой воспроизводимостью, не требует больших временных и материальных затрат. Течение воспалительного процесса хорошо контролируется. Изменяя концентрацию, продолжительность и число курсов воздействия ДСН, можно моделировать острый, хронический и рецидивирующий колит разной тяжести. Точный механизм действия ДСН неизвестен, но показано, что ДСН разрушает слой слизи, ДСН в комплексе с жирными кислотами проникает в эпителиальные клетки и вызывает их гибель, что приводит к нарушению эпителиального барьера, при этом ДСН поглощается макрофагами, что приводит к их провоспалительной активации [4].

Хотя модель ДСН-индуцированного колита давно и широко используется, полностью стандартизовать ее не удается. Вариативность проявлений ДСН-индуцированного колита обусловлена как характеристиками самого ДСН (концентрация, молекулярная масса, производитель и партия) и продолжительностью его воздействия, так и генетическими особенностями животных (линия, пол) и микробиомом кишечника [4].

Целью исследования стала подробная характеристика модели колита умеренной тяжести, индуцированного 1%-ным раствором ДСН, у самцов мышей C57BL/6.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 30 половозрелых самцах мышей C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая» (филиал ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»). Мышей содержали при 18–25°C и естественном освещении, со свободным доступом к воде и комбикорму. Для индукции колита животным воду в поилках на 5 сут заменяли на 1%-ный раствор ДСН (молекулярная масса ~40,000, AppliChem, Германия), далее 2 сут животные получали питьевую воду. Животные контрольной группы на протяжении всего эксперимента получали питьевую воду. Мышей выводили из эксперимента на 7-е сут методом цервикальной дислокации. У 8 животных из опытной группы ободочную кишку и брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) фиксировали в 10%-ном буферном нейтральном формалине. У 7 животных из опытной группы ободочную кишку фиксировали в IntactRNA («Евроген», Россия) для определения экспрессии генов. У 5 животных

из опытной группы забирали каловые массы для анализа состава просветной микрофлоры.

Изготавливали гистологические препараты БЛУ, окрашенные гематоксилином и эозином, и провели их морфологическое исследование.

Гистологические срезы дистального отдела ободочной кишки, окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим pH 1,0, проводили ШИК-реакцию (окраска реактивом Шиффа после окисления йодной кислотой) и иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к CD68 (DF7518 Affinity Biosciences, Китай, разведение 1/100) и хромогранину А (CgA) (ab15160, Abcam Inc, Великобритания, разведение 1/200), использовали вторичные антитела с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (A11008, Invitrogen, США, разведение 1/300). Проводили морфологическое исследование препаратов в программе ImageJ.

Оценка распространенности язвенно-воспалительного процесса. Продольные срезы кишки сканировали по всей длине при увеличении 100. Рассчитывали % длины участков с язвами и воспалительной инфильтрацией от общей длины среза.

Оценка воспалительной инфильтрации. Окрашенные гематоксилином и эозином препараты фотографировали при увеличении 320 в двух полях зрения, рассчитывали число клеток на 1 мм² собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО).

Оценка объемной доли макрофагов. Препараты, окрашенные антителами к CD68, фотографировали при увеличении 200 в двух полях зрения, проводили бинаризацию снимков. Определяли объемную долю макрофагов как отношение площади CD68⁺ клеток к площади слизистой оболочки.

Оценка числа эндокринных клеток. Препараты, окрашенные антителами к CgA, фотографировали при увеличении 100 в двух полях зрения. Подсчитывали число CgA⁺-клеток на 1 мм² слизистой оболочки.

Оценка объемной доли бокаловидных клеток (БК) и содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов. Срезы, окрашенные альциановым синим pH 1,0 и с ШИК-реакцией, фотографировали при увеличении 200 в трех полях зрения при одинаковых условиях освещения. Проводили бинаризацию снимков, устанавливая порог так, чтобы выделенными оказывались только БК. Определяли объемную долю БК как отношение площади БК к площади слизистой оболочки. Рассчитывали оптическую плотность БК как десятичный логарифм отношения средней яркости точек фона к средней яркости точек БК. Чем выше оптическая плотность, тем выше содержание высокосульфатированных (альциановый синий) или нейтральных (ШИК-реакция) муцинов в БК.

Оценка уровней экспрессии генов. Определяли уровни экспрессии генов, кодирующих белки эпителиального барьера кишки: муцины *Muc1*, *Muc3*

и клаудины *Cldn2*, *Cldn4*, *Cldn7*, про- и антиапоптозные факторы *Bax* и *Bcl2*. Выделение РНК и последующую обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческих наборов RNA-Extract Plus (bn-rxtr, Bioinnlabs, Россия) и MMLV RT Kit («Евроген», Россия), соответственно. Уровни экспрессии оценивали методом qPCR-RT относительно уровня экспрессии мРНК β -актина *Actb* на приборе DTprime («ДНК-Технология», Россия). Праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) подбирали с помощью онлайн-программы primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями, синтезировали в компании «Евроген» (Россия). Реакцию проводили с использованием готовой смеси 5× qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) с олигонуклеотидами в конечных концентрациях 0,2–0,4 мкМ. Последовательности праймеров:

- *Actb* For: CCTGCCACCCAGCACAAT; Rev: GGGCCGGACTCGTCATAC

- *Cldn2* For: TGCGACACACAGCACAGGCATCAC; Rev: TCAGGAACCAGCGGCGAGTAG

- *Cldn4* For: TCGTGGGTGCTCTGGGGATGCT; Rev: GCGGATGACGTTGTGAGCGGTC

- *Cldn7* For: GCCTTGGTAGCATGTTCTCTGGA; Rev: GGTACGCAGCTTTGCTTTCACTG

- *Muc1* For: GGTGACCACTTCTGCCAACT; Rev: TCCTTCTGAGAGCCACCACT

- *Muc3* For: TGTTACGCTTTACTGTGTTTCAA; Rev: TTGCATGTCTCCTCAGGATT

- *Bcl2* For: CATGGACTGGAGAAGGGACT; Rev: ACCCATTTCTTCTGATGC

- *Bax* For: GCTGATGGCAACTTCAACTG; Rev: CCACCCTGGTCTTGGATC

Относительную концентрацию мРНК рассчитывали по формуле: $[A]_0/[B]_0 = E^{\Delta C(T)}$, где $[A]_0$ — начальная концентрация мРНК целевого гена в ПЦР-смеси; $[B]_0$ — начальная концентрация мРНК *Actb* в ПЦР-смеси; E — эффективность реакции (принимается за 1,98), $\Delta C(T)$ — разность пороговых циклов *Actb* и целевого гена.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США). Использовали методы непараметрической статистики в связи с малым размером выборки и отличным от нормального распределением значений параметров (критерий χ^2). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи — Me (25%; 75%). Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Выполнили метагеномный анализ микрофлоры кишечника. Замороженные образцы каловых масс пяти случайно выбранных мышей из каждой группы были переданы в ООО «Хроматест» (Россия) для выделения ДНК, секвенирования гена 16S рРНК с последующим проведением метагеномной классификации с помощью Kraken 2. Статистическую обработку полученных данных про-

водили с помощью пакета DESeq2 в программной среде R, оценивали изменения состава кишечного микробиома на уровне родов и семейств. Коррекцию уровня значимости с учетом множественного тестирования проводили с использованием подхода Бенджамини-Хохберга (False Discovery Rate, FDR). Статистически значимыми считали изменения с уровнем $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании у животных контрольной группы в дистальном отделе ободочной кишки эпителиальная выстилка была сохранной на всем протяжении слизистой оболочки, крипты были глубокие, их просветы узкие. СПСО и подслизистая основа содержали небольшое количество равномерно распределенных клеточных элементов — фиброцитов, фибробластов, лимфоцитов и единичных гистиоцитов. При колите морфологическая картина ободочной кишки была мозаичной. Наиболее выраженные патологические изменения в ободочной кишке были представлены обширными, распространяющимися до мышечной пластинки язвами. В зонах с сохраненной эпителиальной выстилкой и криптами выявлялись участки с выраженной воспалительной инфильтрацией. В этих участках число БК было резко снижено. Также были участки, не отличающиеся от нормы. Распространенность язвенно-воспалительного процесса варьировала между животными и составляла 34–100% длины среза. Выявленные изменения соответствуют литературным данным по острому ДСН-индуцированному колиту и обострению ЯК у человека [4]. Выраженность изменений соответствовала умеренному течению патологического процесса (рис. 1).

При гистологическом исследовании БЛУ мышцей контрольной группы было выявлено нормальное строение ткани. БЛУ окружены соединительнотканной капсулой, наружная кора образована лимфоидными узелками и межфолликулярной зоной лимфоцитов. В лимфоидных узелках определялись небольшие светлые центры, представленные лимфоцитами и небольшим числом зрелых лимфоцитов, выявлялись единичные митозы и скопления фрагментов ядер. Паракортикальная зона была плотно заселена лимфоцитами. Мозговые тяжи были представлены лимфоцитами, гистиоцитами, единичными плазмócитами, ретикулярными клетками, коллагеновыми и ретикулярными волокнами. Краевой, промежуточные и мозговые синусы были узкими, в них выявлялось небольшое число лимфоцитов и макрофагов в соотношении примерно 1:1. У мышей с острым колитом по сравнению с контрольной группой в лимфоидных узелках выявлялись широкие светлые центры; в мозговых тяжах наблюдалось большое количество плазмócитов; краевой, промежуточные и мозговые синусы

были расширены и заполнены лимфоцитами и макрофагами, макрофаги преобладали. Таким образом, при остром колите в БЛУ наблюдались гиперплазия коркового вещества, плазматизация мозговых тяжей и макрофагальная реакция в синусах (рис. 2А, Е). Полученные нами результаты согласуются с данными литературы по ЯК у человека и ДСН-индуцированному колиту у мышей [7].

При морфометрических исследованиях у мышей с острым колитом изменения в слизистой оболочке ободочной кишки оценивали в зонах без язв, но с выраженными воспалительными изменениями. При колите снижалась объемная плотность БК и содержание в них нейтральных муцинов, при

этом содержание высокосульфатированных муцинов не изменялось (рис. 2Б, В, Ж, З). Возрастало число эндокринных CgA^+ -клеток, увеличивалось содержание клеток в СПСО и объемная доля макрофагов в слизистой оболочке (рис. 2Г, Д, И, К).

Для ЯК характерно снижение числа БК, количества внутриклеточной и внеклеточной слизи, что коррелирует с тяжестью течения заболевания [8]. При активном ЯК показано значительное снижение сульфатирования муцина в БК [4]. При остром ДСН-индуцированном колите выявлено статистически значимое снижение числа ШИК-положительных БК в ободочной кишке у мышей [9], что согласуется с нашими результатами.

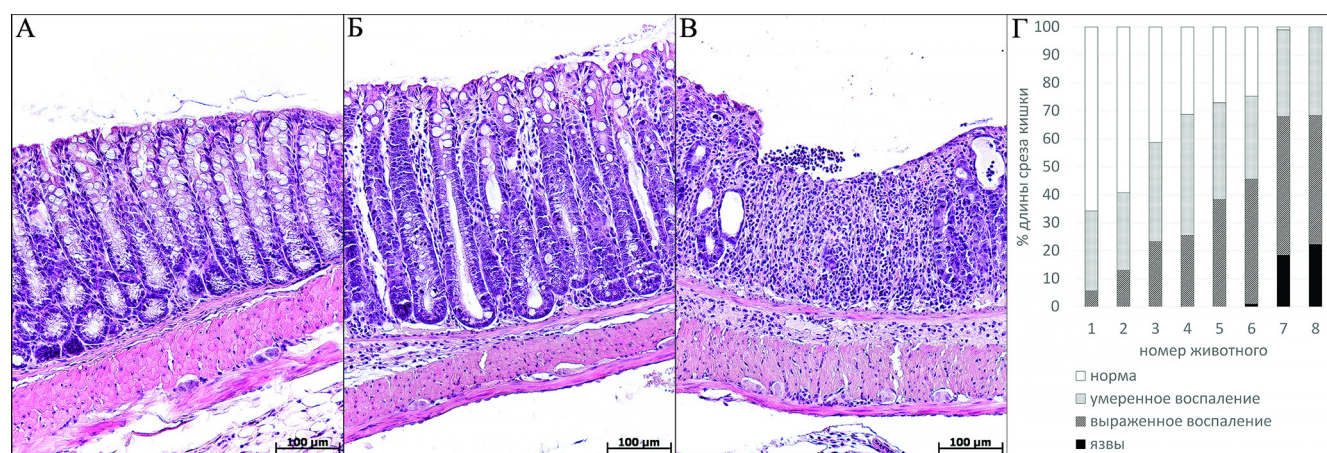


Рис. 1. Дистальный отдел ободочной кишки мышей контрольной группы (А) и животных с острым колитом (Б, В), окраска гематоксилином и эозином. Г – распространенность язвенно-воспалительного процесса в ободочной кишке у мышей с острым колитом.

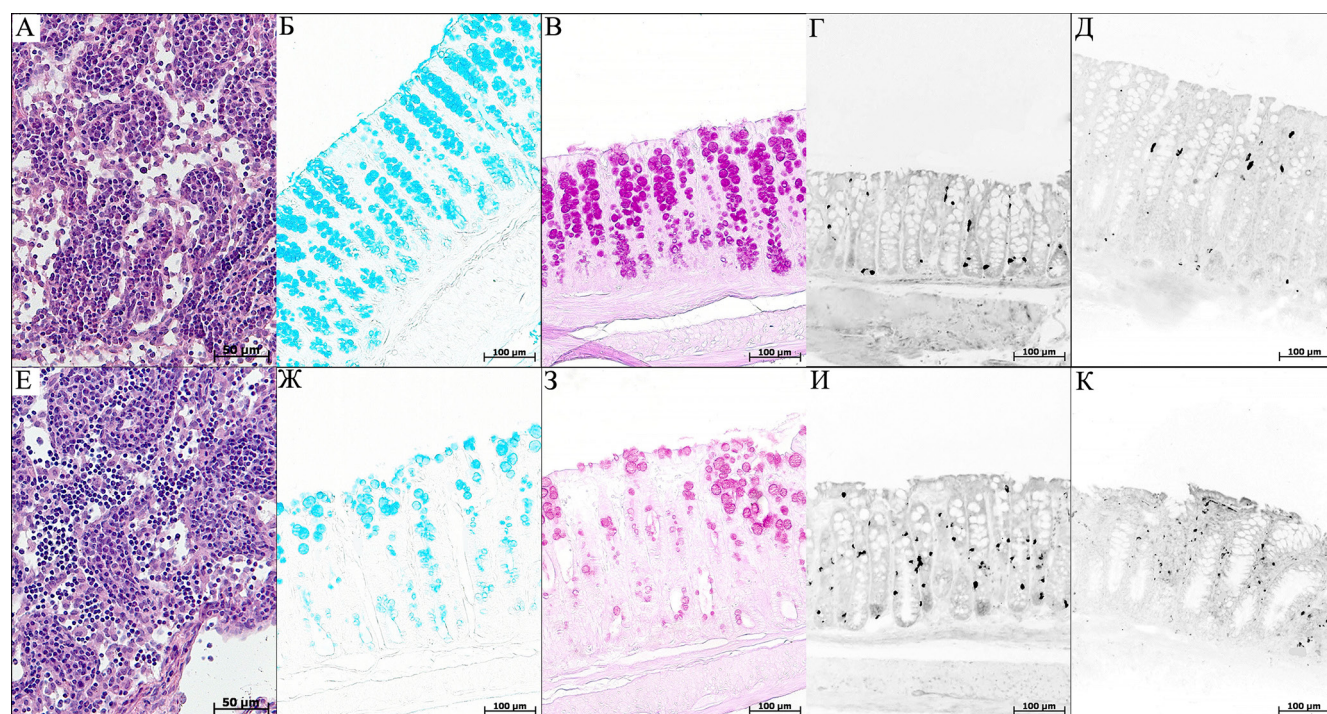


Рис. 2. Брыжеечные лимфатические узлы и дистальный отдел ободочной кишки мышей контрольной группы (А–Д) и животных с острым колитом (Е–К). А, Е – мозговое вещество лимфатических узлов. Окраска гематоксилин и эозин. Б, Ж – высокосульфатированные муцины, окраска альтаиановым синим. В, З – нейтральные муцины, ШИК-реакция. Г, И – эндокринные клетки, антитела к хромогранину А. Д, К – макрофаги, антитела к CD68

Эндокринные клетки мы выявляли по гликопротеину СgА, накапливающемуся в секреторных гранулах вместе с гормонами. В толстой кишке у человека наличие СgА показано во всех Ес- и L-клетках и в единичных D-клетках, а у мышей – только в Ес-клетках [10, 11]. Следовательно, число СgА⁺-клеток в толстой кишке мышей отражает количество Ес-клеток. У людей при обострении ЯК число Ес-клеток в толстой кишке снижается, а в период ремиссии и при длительном течении заболевания – увеличивается. Снижение количества Ес-клеток при обострении ЯК, вероятно, связано с их гиперсекрецией. При длительном умеренном течении заболевания повышенная стимуляция секреции серотонина приводит к гиперплазии Ес-клеток. При остром ДСН-индуцированном колите число СgА⁺-клеток возрастает [4], что согласуется с нашими данными.

Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки преимущественно лимфоцитами, нейтрофилами и плазмócитами характерна для ЯК у человека и ДСН-индуцированного колита у мышей. Также при ЯК усиливается миграция моноцитов в область воспаления и выявлена корреляция тяжести течения заболевания с накоплением маркера макрофагов CD68 [12]. В модели ДСН-индуцированного колита также показано увеличение числа CD68⁺ макрофагов в ободочной кишке [4, 13].

При остром колите повышалась экспрессия клаудинов *Cldn4* и *Cldn7*, про- и антиапоптотического факторов *Bax* и *Bcl2*. Экспрессия мРНК муцинов *Muc1*, *Muc3* и клаудина *Cldn2* статистически значимо не изменялась (таблица).

По данным литературы у больных ЯК содержание *MUC1* в толстой кишке возрастает. При тяжелом ЯК выявлено увеличение экспрессии мРНК *MUC1* в зоне крипт-абсцессов [14]. По одним дан-

ным, при ЯК экспрессия мРНК *MUC3* не изменяется [14], по другим – содержание гликопротеина *MUC3* при тяжелом течении заболевания снижается [8]. При остром ДСН-индуцированном колите было показано повышение экспрессии мРНК *Muc1* и *Muc3* [15]. В наших более ранних исследованиях статистически значимого изменения уровня экспрессии мРНК *Muc1* не выявлено, но обнаружено снижение *Muc3* [16].

В ободочной кишке у больных ЯК значительно возрастает содержание белка клаудина 2 [17–20]. Относительно экспрессии мРНК клаудина 2 при ЯК данные противоречивы. Согласно данным Ошима и др. [18] и Рэндалл и др. [21], уровень мРНК *CLDN2* возрастает, согласно Чужич и др. [22] – не изменяется. У животных с ДСН-индуцированным колитом в ободочной кишке возрастает содержание белка клаудина 2 [23–26], а экспрессия его мРНК по разным данным повышается [27], не изменяется [23] или снижается [22]. У мышей с дефицитом клаудина-2 (*Cldn2*^{-/-}) ДСН-индуцированный колит протекает тяжелее [28]. Напротив, у трансгенных мышей с гиперэкспрессией клаудина-2 ДСН-индуцированный колит протекает легче. У таких животных была повышена проницаемость слизистой оболочки, увеличена пролиферативная активность колоноцитов, было больше регуляторных (CD4⁺Foxp3⁺) Т-клеток, выше продукция противовоспалительного TGF-β клетками эпителия толстой кишки [29]. Таким образом, повышение продукции клаудина 2 при колите является адаптивной реакцией. Мы не выявили изменения экспрессии мРНК *Cldn2* в нашем эксперименте, что может быть связано либо с относительно легким течением колита, либо с посттранскрипционной регуляцией синтеза белка.

Таблица

Морфологические и молекулярные изменения в слизистой оболочке ободочной кишки у мышей при остром колите Ме (25–75%)

Показатель		Контроль	Язвенный колит	p
Высокосульфатированные муцины, усл. ед.		1 (0,99–1,02)	0,92 (0,85–1,13)	0,46
Нейтральные муцины, усл. ед.		1 (0,96–1,02)	0,93 (0,91–0,94)	0,027
Объемная доля БК, %		30 (33,2–40,8)	16,3 (14,3–19,7)	0,00078
Эндокринные клетки, кл./мм ²		112 (102–117)	138 (120–189)	0,0063
Клетки в СПСО, кл./мм ²		145 (142–154)	258 (235–262)	0,00078
Объемная доля макрофагов, %		0,62 (0,53–0,63)	0,80 (0,75–0,87)	0,00078
Экспрессия мРНК генов относительно β-актина	<i>Muc1</i>	0,56 (0,51–0,90)	1,19 (0,79–1,51)	0,084
	<i>Muc3</i>	5,52 (4,49–14,35)	31,49 (7,76–34,89)	0,064
	<i>Cldn2</i>	0,81 (0,66–1,11)	1,73 (1,15–3,09)	0,084
	<i>Cldn4</i>	0,51 (0,43–0,62)	3,92 (1,91–4,78)	0,0017
	<i>Cldn7</i>	0,46 (0,38–0,52)	1,79 (1,56–2,35)	0,0017
	<i>Bax</i>	0,15 (0,13–0,29)	1,11 (0,85–8,60)	0,0017
	<i>Bcl2</i>	0,18 (0,16–0,25)	1,27 (0,79–5,33)	0,0017

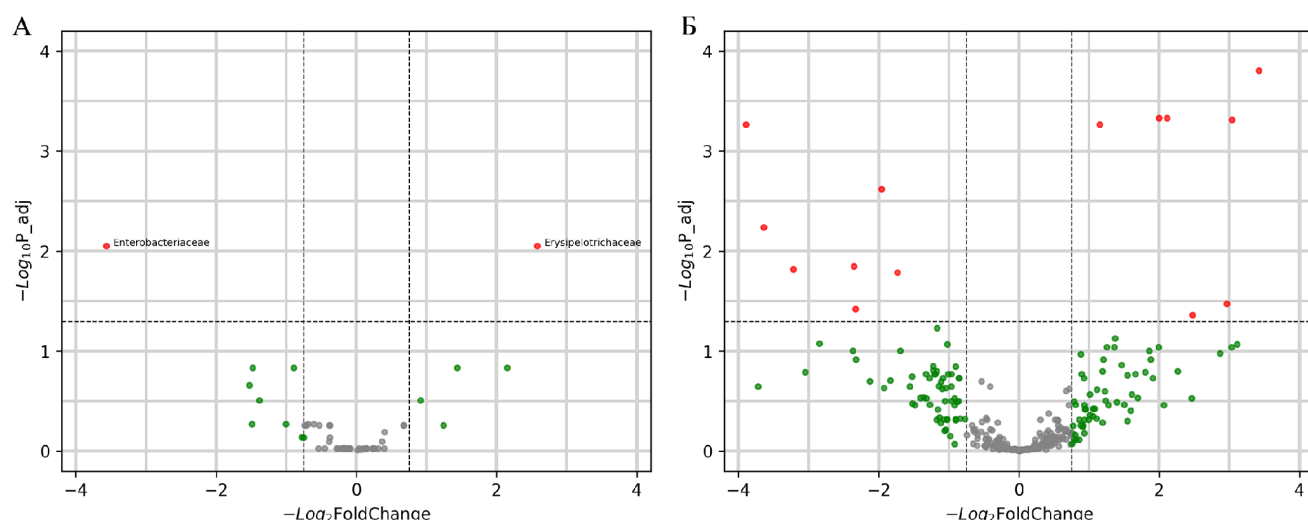


Рис. 3. Изменения состава микрофлоры кишечника мышей при остром колите на уровне семейств (А) и на уровне родов (Б).

В толстой кишке у больных ЯК уровень белка клаудина 4 по одним данным снижается [17, 18], по другим — не изменяется [19], а согласно Веберу и др. [20] — возрастает при средней активности воспаления. Экспрессия мРНК клаудина 4 не изменяется [22, 30]. При экспериментальном ДСН-индуцированном колите содержание белка клаудина 4 снижается [23, 31, 32]. Экспрессия мРНК *Cldn4*, согласно большинству исследований, не изменяется [23, 24, 27, 33], однако Чужич и др. [22] выявили ее повышение при хроническом колите. У мышей с нокаутированным геном клаудина-4 (*Cldn4*^{-/-}) развиваются симптомы, похожие на колит, связанные с повышенной проницаемостью кишечника [23]. Клаудины 2 и 4 являются антагонистами на белковом уровне и конкурируют за место в плотных контактах [34]. Вероятно, наблюдаемое нами повышение экспрессии *Cldn4* является адаптивной реакцией.

При ЯК показано снижение содержания белка и экспрессии мРНК клаудина 7 [18], а также уменьшение числа клаудин 7-положительных клеток [35]. У животных при ДСН-индуцированном колите содержание белка клаудина 7 снижается [26, 35, 36], а экспрессия мРНК не изменяется [33]. У мышей с нокаутом клаудина-7 вскоре после рождения развивается тяжелый спонтанный колит [34], а у мышей с индуцируемым кишечным условным нокаутом гена *Cldn7* тяжелее протекает ДСН-индуцированный колит [37]. Вероятно, наблюдаемое нами повышение экспрессии *Cldn7* также является адаптивной реакцией.

При ЯК у человека и ДСН-индуцированном колите у животных в ободочной кишке возрастает число гибнущих и пролиферирующих клеток, причем эти изменения коррелируют с тяжестью воспалительного процесса [4].

Выявленные морфофункциональные и молекулярно-биологические изменения указывают на повреждение эпителиального барьера ободочной

кишки, повышение его проницаемости и активацию воспалительных реакций в зонах слизистой оболочки без язв.

Анализ с применением поправки Бенджамини—Хохберга показал, что индукция колита ассоциирована со статистически значимыми изменениями в отношении состава представителей семейств *Erysipelotrichaceae* и *Enterobacteriaceae*. При этом увеличение доли микроорганизмов более чем в 1,5 раза наблюдалось для семейства *Erysipelotrichaceae*, в то время как для семейства *Enterobacteriaceae* наблюдалось снижение доли микроорганизмов (рис. 3А).

При анализе родового разнообразия кишечной микрофлоры статистически значимое изменение доли микроорганизмов, вследствие индукции колита наблюдалось для 19 родов: *Butyrivibrio*, *Sedimentibacter*, *Peptostreptococcus*, *Allobaculum*, *Holdemanella*, *Barnesiella*, *Paludibacter*, *Petrimonas*, *Rhodocytophaga*, *Halopolyspora*, *Ruminococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Paraprevotella*, *Bacteroides*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Legionella*, *Succinivibrio*. Статистически значимое увеличение доли микроорганизмов более чем в 1,5 раза наблюдалось для родов *Butyrivibrio*, *Sedimentibacter*, *Peptostreptococcus*, *Allobaculum*, *Holdemanella*, *Barnesiella*, *Paludibacter*, *Petrimonas*, *Rhodocytophaga*, *Halopolyspora*, в то время как для родов *Ruminococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Paraprevotella*, *Bacteroides*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Legionella*, *Succinivibrio* наблюдалось статистически значимое снижение доли микроорганизмов (рис. 3Б). Выборки для анализа были небольшие, поэтому полученные результаты следует рассматривать как предварительные.

Большое количество современных исследований подтверждают, что микробиота кишечника влияет на метаболизм организма в целом и, таким образом, участвует в регуляции различных физиологических и патологических процессов, в том чис-

ле воспалительных заболеваний [38–40]. Показано, что бактерии, населяющие толстый кишечник, синтезируют ряд короткоцепочечных жирных кислот, витаминов и незаменимых аминокислот, тем самым поддерживая иммунную микросреду кишечника. При воспалительных заболеваниях кишечника наблюдается снижение разнообразия и нарушение баланса бактерий по сравнению с этими показателями у здоровых людей и лабораторных животных. Так, известно о значительном снижении представленности таксонов *Firmicutes*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidales*, а также *Clostridiales*, продуцирующих бутират, в образцах кала пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [41, 42]. Так как бутират способствует выработке муцина и антимикробных пептидов, то снижение количества бактерий-продуцентов приводит к снижению барьерной функции слизистой оболочки кишечника и развитию воспаления.

Заключение

Таким образом, острый колит, индуцированный 1%-ным раствором ДСН, у самцов мышей C57BL/6 характеризуется развитием в ободочной

кишке язвенно-воспалительного процесса умеренной тяжести, а в брыжеечных лимфатических узлах — гиперплазии коркового вещества, плазматизации мозговых тяжей и увеличения числа макрофагов в синусах. В ободочной кишке в зонах вне язв выявляется выраженная воспалительная инфильтрация, увеличивается содержание CD68+ макрофагов. Снижается объемная доля БК и содержание в них нейтральных муцинов. Возрастает число эндокринных клеток, продуцирующих серотонин. Возрастает экспрессия компонентов плотных контактов клаудинов 4 и 7, а также про- и антиапоптотических факторов *Vax* и *Bcl2*. Наблюдаются выраженные изменения состава кишечной микрофлоры.

Работа выполнена в рамках государственного задания Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского (№122030200530-6). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены локальным этическим комитетом РНЦХ имени академика Б.В. Петровского (протокол № 7 от 03.12.2021 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркова А.А., Кашкина Е.И. Современные методы диагностики и оценки тяжести течения неспецифического язвенного колита. *Вестник ТГУ*. 2012;17(3):915–919.
2. Du L., Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2020;49(4):643–654.
3. Bolotova E.V., Yumukyan K.A., Dudnikova A.V. Modern idea of the mechanisms of development and predictors of ulcerative colitis severity. *Doctor. Ru.* 2022;21(2):34–39.
4. Золотова Н.А., Архиева Х.М., Зайратьянц О.В. Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите. *Экспер. клин. гастроэнтерол.* 2019;(2):4–13.
5. Katsandegwaza B., Horsnell W., Smith K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(16):9344.
6. Sann H., Erichsen J.V., Hessmann M., Pahl A., Hoffmeyer A. Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice. *Life Sci.* 2013;92(12):708–718.
7. Postovalova E.A., Khochansky D.N., Zolotova N.A., Gao Y., Makarova O.V., Dobrynina M.T. Morphological changes in mesenteric lymph nodes and lymphocyte subpopulation composition in experimental ulcerative colitis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;160(6):835–839.
8. Дорофеев А.Э., Василенко И.В., Рассохина О.А. Изменения экспрессии MUC2, MUC3, MUC4, TFF3 в слизистой оболочке толстого кишечника у больных неспецифическим язвенным колитом. *Гастроэнтерол.* 2013;47(1):80–84.
9. Issa C.M., Hambly B.D., Wang Y., Maleki S., Wang W., Fei J., Bao S. TRPV2 in the development of experimental colitis. *Scand. J. Immunol.* 2014;80(5):307–312.
10. Portela-Gomes G.M., Stridsberg M. Chromogranin A in the human gastrointestinal tract: an immunocytochemical study with region-specific antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50(11):1487–1492.
11. Engelstoft M.S., Lund M.L., Grunddal K.V., Egerod K.L., Osborne-Lawrence S., Poulsen S.S., Zigman J.M., Schwartz T.W. Research resource: a chromogranin A reporter for serotonin and histamine secreting enteroendocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 2015;29(11):1658–1671.
12. Na Y.R., Stakenborg M., Seok S.H., Matteoli G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16(9):531–543.
13. Jang S., Jang S., Ko J., Bae J.E., Hyung H., Park J.Y., Lim S.G., Park S., Park S., Yi J., Kim S., Kim M.O., Cho D.H., Ryoo Z.Y. HSPA9 reduction exacerbates symptoms and cell death in DSS-induced inflammatory colitis. *Sci. Rep.* 2024;14(1):5908.
14. Longman R.J., Poulson R., Corfield A.P., Warren B.F., Wright N.A., Thomas M.G. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J. Histochem. Cytochem.* 2006;54(12):1335–1348.
15. Hoebler C., Gaudier E., De Coppet P., Rival M., Cherbut C. MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig. Dis. Sci.* 2006;51(2):381–389.
16. Zolotova N.A., Polikarpova A.V., Khochanskii D.N., Makarova O.V., Mikhailova L.P. Expression of mucins and claudins in the colon during acute and chronic experimental colitis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018;165(4):434–437.

17. Das P., Goswami P., Das T.K., Nag T., Sreenivas V., Ahuja V., Panda S.K., Gupta S.D., Makharia G.K. Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective. *Virchows Arch.* 2012;460(3):261–270.
18. Oshima T., Miwa H., Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008;23 Suppl. 2:S146–S150.
19. Prasad S., Mingrino R., Kaukinen K., Hayes K.L., Powell R.M., MacDonald T.T., Collins J.E. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* 2005;85(9):1139–1162.
20. Weber C.R., Nalle S.C., Tretiakova M., Rubin D.T., Turner J.R. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab. Invest.* 2008;88(10):1110–1120.
21. Randall K., Henderson N., Reens J., Eckersley S., Nyström A.C., South M.C., Balendran C.A., Böttcher G., Hughes G., Price S.A. Claudin-2 expression levels in ulcerative colitis: development and validation of an in-situ hybridisation assay for therapeutic studies. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162076.
22. Čužić S., Antolić M., Ognjenović A., Stupin-Polančec D., Petrinić Grba A., Hrvačić B., Dominis Kramarić M., Musladin S., Požgaj L., Zlatar I., Polančec D., Aralica G., Banić M., Urek M., Mijandrušić Sinčić B., Čubranić A., Glojnaric I., Bosnar M., Eraković Haber V. Claudins: beyond tight junctions in human IBD and murine models. *Front. Pharmacol.* 2021;12:682614.
23. Liu S., Wang Z., Xiang Q., Wu B., Lv W., Xu S. A comparative study in healthy and diabetic mice followed the exposure of polystyrene microplastics: Differential lipid metabolism and inflammation reaction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022;244:114031.
24. Al-Failakawi A., Al-Jarallah A., Rao M., Khan I. The role of claudins in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis: the effects of nobiletin. *Biomolecules.* 2024;14(9):1122.
25. Kim H.Y., Jeon H., Bae C.H., Lee Y., Kim H., Kim S. Rumex japonicus Houtt. alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by protecting tight junctions in mice. *Integr. Med. Res.* 2020;9(2):100398.
26. Yuan B., Zhou S., Lu Y., Liu J., Jin X., Wan H., Wang F. Changes in the expression and distribution of claudins, increased epithelial apoptosis, and a mannan-binding lectin-associated immune response lead to barrier dysfunction in dextran sodium sulfate-induced rat colitis. *Gut Liver.* 2015;9(6):734–740.
27. Золотова Н.А., Поликарпова А.В., Хочанский Д.Н., Макарова О.В., Михайлова Л.П. Экспрессия муцинов и клаудинов в ободочной кишке при остром и хроническом экспериментальном колите. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2018;165(4):421–424.
28. Nishida M., Yoshida M., Nishiumi S., Furuse M., Azuma T. Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase-dependent signaling. *Dig. Dis. Sci.* 2013;58(6):1546–1559.
29. Ahmad R., Chaturvedi R., Olivares-Villagómez D., Habib T., Asim M., Shivesh P., Polk D.B., Wilson K.T., Washington M.K., Van Kaer L., Dhawan P., Singh A.B. Targeted colonic claudin-2 expression renders resistance to epithelial injury, induces immune suppression, and protects from colitis. *Mucosal Immunol.* 2014;7(6):1340–1353.
30. Lameris A.L., Huybers S., Kaukinen K., Mäkelä T.H., Bindels R.J., Hoenderop J.G., Nevalainen P.I. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2013;48(1):58–69.
31. Cai L., Li X., Geng C., Lei X., Wang C. Molecular mechanisms of somatostatin-mediated intestinal epithelial barrier function restoration by upregulating claudin-4 in mice with DSS-induced colitis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018;315(4):C527–C536.
32. Mennigen R., Nolte K., Rijcken E., Utech M., Loeffler B., Senninger N., Bruewer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009;296(5):G1140–G1149.
33. Arinno A., Sukmak P., Kulworasreth P., Sricharunrat T., Vaddhanaphuti C.S., Pongkorpsakol P. Gallic acid serves as an effective therapeutic agent of inflammatory bowel disease: pharmacological impacts on tight junction-dependent intestinal permeability *in vivo* and its related intracellular signaling. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* 2025;8:100223.
34. Capaldo C.T. Claudin barriers on the brink: how conflicting tissue and cellular priorities drive IBD pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(10):8562.
35. Wang K., Ding Y., Xu C., Hao M., Li H., Ding L. Cldn-7 deficiency promotes experimental colitis and associated carcinogenesis by regulating intestinal epithelial integrity. *Oncoimmunology.* 2021;10(1):1923910.
36. Ogata M., Ogita T., Tari H., Arakawa T., Suzuki T. Supplemental psyllium fibre regulates the intestinal barrier and inflammation in normal and colitic mice. *Br. J. Nutr.* 2017;118(9):661–672.
37. Ding Y., Wang K., Xu C., Hao M., Li H., Ding L. Intestinal Claudin-7 deficiency impacts the intestinal microbiota in mice with colitis. *BMC Gastroenterol.* 2022;22(1):24.
38. 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.
39. Zong W., Friedman E.S., Allu S.R., Firman J., Tu V., Daniel S.G., Bittinger K., Liu L., Vinogradov S.A., Wu G.D. Disruption of intestinal oxygen balance in acute colitis alters the gut microbiome. *Gut Microbes.* 2024;16(1):2361493.
40. Hong D., Kim H.K., Yang W., Yoon C., Kim M., Yang C.S., Yoon S. Integrative analysis of single-cell RNA-seq and gut microbiome metabarcoding data elucidates macrophage dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Commun. Biol.* 2024;7(1):731.
41. Gevers D., Kugathasan S., Denson L.A., et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):382–392.
42. Mirsepasi-Lauridsen H.C., Vrankx K., Engberg J., Friis-Møller A., Brynskov J., Nordgaard-Lassen I., Petersen A.M., Krogfelt K.A. Disease-specific enteric microbiome dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Front. Med. (Lausanne).* 2018;5:304.

Поступила в редакцию 29.11.2024

После доработки 26.06.2025

Принята в печать 16.09.2025

RESEARCH ARTICLE

The morphofunctional profile of a mouse model of acute moderate dextran sodium sulfate-induced colitis

N.A. Zolotova¹ , M.V. Kirillova¹ , I.S. Tsvetkov¹ , D.Sh. Dzhililova¹ ,
L.V. Ozeretskaya^{1, *} , M.T. Dobrynina^{1, 2} , O.V. Makarova^{1, 2} 

¹*Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery,
3 Tsyurupa Str., Moscow, 117418, Russia;*

²*Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia*

**e-mail: lozloz.o@yandex.ru*

Ulcerative colitis is a socially significant disease, but its etiology is unclear. The most widely used experimental model is dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. The aim of the work was to characterize morphofunctional and molecular biological changes in the colon and mesenteric lymph nodes in acute colitis induced by 1% DSS solution in male C57BL/6 mice. Upon induction of colitis, moderate ulcerative inflammatory process developed in the colon, hyperplasia of the cortex, plasmatisation of the medullary cords and macrophage reaction in the sinuses were observed in the mesenteric lymph nodes. Inflammatory infiltration, increased macrophage content, decreased volume fraction of goblet cells and neutral mucin content in them, increased endocrine cell content, increased expression of *Cldn4*, *Cldn7*, *Bax* and *Bcl2* were detected in the colon. Pronounced changes in the composition of intestinal microflora were observed.

Keywords: *ulcerative colitis, experimental colitis, dextran sulfate sodium, microflora, biological model, inflammation*

Funding: This study was performed under the state assignment of Petrovsky National Research Center of Surgery, project no. 122030200530-6.

Сведения об авторах

Золотова Наталья Александровна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: natashazltv@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9889>

Кириллова Мария Валерьевна — мл. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: nmarusyasilina99@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7781-5537>

Цветков Иван Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: davedm66@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>

Джалилова Джулия Шавкатовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. 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>

Озерецкая Любовь Владимировна — лаб.-иссл. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: lozloz.o@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8646-3952>

Добрынина Мариэтта Тиграновна — канд. биол. наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: mariettadobrynina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0361-1184>

Мakarova Ольга Васильевна — докт. мед. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. 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 612.85.01

Сравнительное исследование слуховой чувствительности крыс линии Wistar и крыс-гетерозигот со сниженной экспрессией гена транспортера дофамина DAT-1

Г.Д. Хорунжий^{1,*} , М.А. Егорова¹ , З.С. Фесенко², Е.В. Ефимова² 

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова, Российская академия наук, Россия, 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

²Санкт-Петербургский государственный университет, Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета, Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

*e-mail: khorunzhii.gd@gmail.com

Выполнено сравнительное исследование характеристик слуховой чувствительности интактных крыс линии Wistar и крыс-гетерозигот трансгенной линии DAT-het (dopamine transporter heterozygous) со сниженным уровнем экспрессии гена *Slc6a3*, кодирующего дофаминовый транспортер обратного захвата 1 (dopamine transporter 1, DAT-1), представляющих собой экспериментальную модель патологии системы дофаминергических нейронов (синдром дефицита внимания и гиперактивности). В ходе работы анализировали амплитудные и временные параметры коротколатентных стволовых слуховых вызванных потенциалов, зарегистрированных у крыс обеих линий при действии парных щелчков и одиночных тональных сигналов. Характеристики слуховой чувствительности крыс линий Wistar и DAT-het были сходными, но, тем не менее, сравнительный анализ амплитуд волн коротколатентных стволовых слуховых вызванных потенциалов выявил значимо большую амплитуду волны 1 у крыс линии DAT-het. Полученные данные позволяют предположить, что гетерозиготы DAT-het отличаются от крыс с нормально функционирующим транспортером обратного захвата дофамина DAT-1 повышенным уровнем дофаминергической передачи сигнала, сопряженной с активацией D1-рецепторов, локализованных в мембранах нейронов спирального ганглия улитки внутреннего уха.

Ключевые слова: крыса, дофаминергическая система, синдром дефицита внимания и гиперактивности, трансгенные животные, слух, коротколатентные стволовые слуховые вызванные потенциалы

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

Введение

Хорошо известно, что нарушения функций дофаминергической системы лежат в основе патогенеза целого ряда тяжелых расстройств центральной нервной системы, включая болезнь Паркинсона и синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) [1–4]. Высокая социальная значимость данных патологий и несовершенство их диагностических критериев (что особенно справедливо в отношении СДВГ) делают актуальной задачей поиск их дополнительных маркеров. Данные о повышенном риске развития тяжелых форм СДВГ у детей, у которых диагностированы нарушения слуха [5, 6], дают основания полагать, что результаты оценки слуховой чувствительности пациента могут быть использованы в качестве дополнительного критерия при диагностике СДВГ, особенно в спорных

и неоднозначных ситуациях. Разработке такого критерия может способствовать исследование характеристик слуха у трансгенных животных — экспериментальных моделей СДВГ.

На сегодняшний день подходы к созданию подобных моделей, в основном, сводятся к получению животных — в первую очередь, мышей и крыс — у которых при помощи методов генной инженерии снижена или подавлена экспрессия генов, кодирующих белки, необходимые для корректной работы системы дофаминергических нейронов [7–10]. К настоящему времени получен целый ряд моделей, в большей или меньшей степени соответствующих клинической картине СДВГ. К ним относятся мыши и крысы, нокаутированные по генам, кодирующим транспортеры обратного захвата дофамина, клеточные рецепторы к дофами-

ну и некоторые другие белки, регулирующие дофаминергическую передачу сигнала [7, 9, 10, 11–14]. Для мышей DAT-ko (dopamine transporter knock-out), нокаутированных по гену *Slc6a3*, кодирующему дофаминовый транспортер DAT-1 (dopamine transporter 1), показаны ключевые поведенческие особенности, традиционно рассматриваемые как симптомы СДВГ (гиперактивность, расстройство внимания, ухудшение показателей рабочей памяти и импульсивное поведение) [10]. У мышей-гетерозигот со сниженной экспрессией гена *Slc6a3* (DAT-het, dopamine transporter heterozygous) поведенческие тесты также подтвердили снижение внимания и гиперреактивность в ответ на внешние стимулы [10]. Вместе с тем, как модельный объект, трансгенные крысы обладают рядом преимуществ по сравнению с мышами, например, лучшей выживаемостью в экспериментах [14].

Одним из наиболее распространенных методов объективной оценки слуховой функции является регистрация так называемых коротколатентных стволовых слуховых вызванных потенциалов (КСВП) – суммарных ответов стволовых слуховых центров на звук [15–19]. Согласно имеющимся данным, КСВП, регистрируемые у нормально слышащей крысы линии Wistar, состоят из пяти волн (пигов), развивающихся в течение первых 6 мс после включения звукового сигнала. Каждый из пиков отражает реакцию на звук сенсорных нейронов, локализованных на определенном уровне слухового восходящего пути (рисунки, А, Б) [18]. При этом волна I соответствует суммарному ответу на звук волокон слухового нерва (первичных слуховых афферентов); волна II отражает реакцию на звуковой сигнал нейронов кохлеарных ядер; волна III соответствует включению в процесс обработки звуковой информации ядер верхнеоливарного комплекса; наконец, формирование волн IV и V является следствием анализа поступающего звукового сигнала нейронами ядер латеральной петли и задних холмов среднего мозга [15, 18].

В настоящее время в литературе отсутствуют публикации, посвященные сравнительным исследованиям характеристик слуха у здоровых животных и животных с нарушением функций дофаминового транспортера. Настоящая работа представляет собой первую попытку объективной оценки и сопоставления показателей слуховой чувствительности крыс линии Wistar и крыс выведенной на ее основе трансгенной линии DAT-het.

Материалы и методы

В исследовании регистрировали КСВП у интактных крыс линии Wistar и крыс-гетерозигот трансгенной линии DAT-het (Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия) со сниженной экспрессией гена *Slc6a3*,

кодирующего транспортер обратного захвата дофамина DAT-1. Характеристики КСВП гетерозигот DAT-het сопоставляли с таковыми у крыс линии Wistar, выступавших в качестве контрольной группы. В экспериментах использовали самок в возрасте 8–10 мес. Каждая группа состояла из 20 животных.

Схема эксперимента была идентичной в обеих группах и заключалась в регистрации КСВП при предъявлении звуковых сигналов (парных щелчков и одиночных тонов) крысам, находившимся в состоянии общей анестезии, поддерживаемой внутримышечными инъекциями телазола (тилетамин + золазепам, 25 мг/кг массы крысы) и ромпуна (ксилазин, 0,7 мг/кг массы крысы) каждые 2 ч. В ходе эксперимента крыса располагалась в звукозаглушенной анэхоидной камере. В начале каждого эксперимента у крысы регистрировали КСВП в ответ на парные щелчки и определяли их порог. Если порог КСВП в ответ на щелчки составлял 50 дБ уровня звукового давления (УЗД) или выше, превышая измеренные в ходе ранее выполненных работ средние пороги КСВП крыс линии Wistar в ответ на щелчки и звуковые тоны [18, 19], данное животное не включали в состав тестовой или контрольной групп.

Для генерации звуковых сигналов с заданными характеристиками использовали специализированную компьютерную систему Sinutronic V1 (Albotronic, Германия). Одиночные тоны (длительность 100 мс, время нарастания и спада 5 мс) и прямоугольные импульсы (длительность 100 мс) после их генерации компьютерной системой поступали на аттенюатор (Kenwood, Япония) и далее – на усилитель мощности (Амфитон 25У-002С, ПО Лорта, Россия) и электродинамический излучатель (Fostex FT17H, Япония). И одиночные тоны, и прямоугольные импульсы (парные щелчки) предъявляли 3 раза в секунду с межимпульсным интервалом 300 мс. При регистрации КСВП использовали тональные сигналы частотой 2, 4, 8, 10, 16, 20, 24, 30, 32 и 45 кГц. Тестовые тоны предъявляли последовательно по 1000 повторений сигнала каждой частоты. Парные щелчки также предъявляли 1000 раз. Сигналы поступали в открытое поле из звукоизлучателя, расположенного на расстоянии 0,55 м от правой ушной раковины животного. Неравномерность частотной характеристики излучателя составляла ± 6 дБ на частотах 2–49 кГц.

КСВП регистрировали с помощью подкожно размещаемых активного и индифферентного серебряных электродов (проволок диаметром 0,25 мм). Оба электрода закрепляли в коже головы крысы – в области вертекса (активный) и за левым ухом (индифферентный). Клипсу заземления располагали на кончике хвоста. Регистрацию КСВП выполняли с помощью дифференциального усилителя биопотенциалов DAM-50 (WPI, США). Выходной сигнал усилителя DAM-50 отфильтровывали

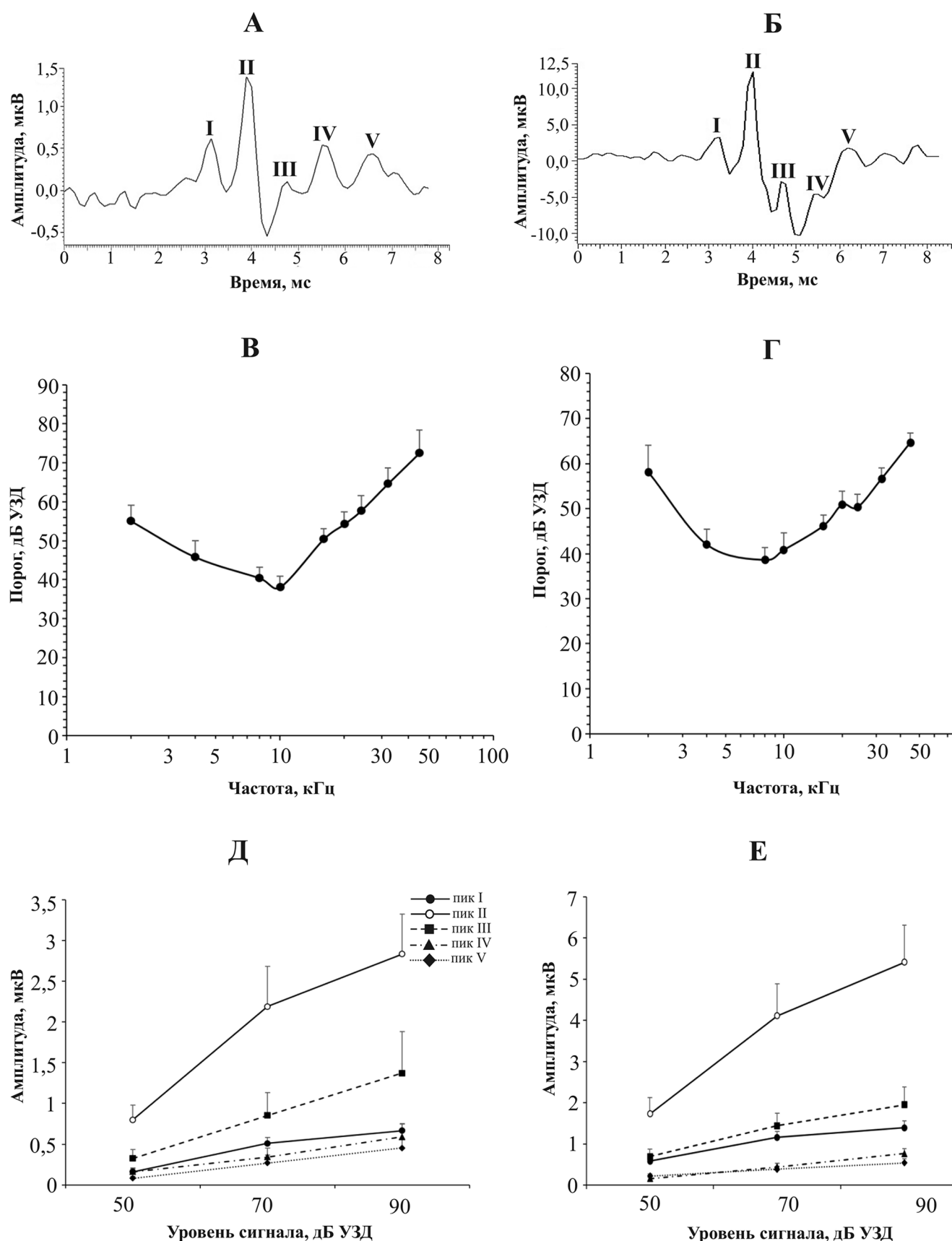


Рисунок. Основные характеристики КСВП, зарегистрированных у крыс линии Wistar и крыс-гетерозигот *DAT*-het. Вверху: примеры КСВП крыс линии Wistar (**А**) и *DAT*-het (**Б**), вызванных предъявлением парных щелчков с уровнем 90 дБ УЗД. Римскими цифрами обозначены амплитудные пики КСВП. В центре: усредненная по всем исследованным животным каждой группы зависимость порогов КСВП крыс линий Wistar (**В**) и *DAT*-het (**Г**), вызванных тональными сигналами, от частоты звука. Внизу: зависимость средней амплитуды пиков I–V КСВП крыс линий Wistar (**Д**) и *DAT*-het (**Е**) от уровня звуковых щелчков. Для средних значений на графиках В–Е указаны стандартные ошибки (mean $\pm$ SE).

(200 Гц – 5 кГц) и усиливали в 10 раз при помощи фильтра Кемо VBF8 (Кемо, Великобритания), после чего он поступал на интерфейс CED1401plus (Cambridge electronic design, Великобритания) для записи полученных данных в компьютер и суммирования КСВП по всем повторениям стимулов при помощи процедуры накопления (среда регистрации и анализа данных CED Spike 2.6.1). Кроме того, выходной сигнал усилителя DAM-50 поступал на вход цифрового запоминающего осциллографа Tektronix MSO 2024 (Tektronix, США), что обеспечивало постоянный визуальный контроль картины регистрируемой активности (в т.ч. частоты сердечных сокращений) и позволяло оценивать глубину анестезии в ходе эксперимента.

Для анализа амплитудных и временных параметров КСВП использовали возможности программного обеспечения CED Spike 2.6.1, с помощью которых оценивали пиковую амплитуду (в мкВ) и латентность (в мс) компонентов КСВП. За латентность каждого пика КСВП принимали промежуток времени от начала действия звукового сигнала до момента достижения максимальной амплитуды (т.е. вершины) пика с учетом акустической задержки (1,6 мс). Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программных пакетов STATISTICA 10 и SigmaPlot 12.1

Результаты исследования

У экспериментальных животных в обеих группах зарегистрированные КСВП состояли из пяти волн (пиков) (рисунок). Латентные периоды, с которыми происходило формирование отдельных волн КСВП, не различались между обеими группами и составляли в среднем от 3 мс (волна I) до 6,6 мс (волна V) (рисунок, А, Б).

У крыс линии Wistar (контрольная группа) минимальные пороги КСВП – как в ответ на парные щелчки, так и при предъявлении одиночных тональных сигналов – составляли 20 дБ УЗД. У крыс-гетерозигот DAT-het минимальные пороги КСВП в ответ на тональные сигналы составляли 30 дБ УЗД, в ответ на парные щелчки – 20 дБ УЗД.

Одной из базовых характеристик слуховой чувствительности животного или человека, анализируемых в психофизических и нейрофизиологических исследованиях слухового восприятия, является слуховая чувствительность по частоте. Для ее оценки в нашей работе для крыс линий Wistar и DAT-het при действии одиночных тонов были получены усредненные по всем животным соответствующей группы частотно-пороговые кривые (т.е. зависимости средних порогов КСВП от частоты предъявляемых тонов). Эти кривые были сходными в обеих группах и соответствовали минимальным порогам КСВП в ответ на тоны 8–10 кГц (рисунок, В, Г). При этом у крыс линии Wistar минимальный порог КСВП соответствовал

частоте сигнала 10 кГц (рисунок, В). У трансгенных крыс-гетерозигот КСВП развивались с минимальным порогом в ответ на тон частотой 8 кГц (рисунок, Г).

Выполненная нами на следующем этапе работы оценка амплитудных параметров КСВП крыс позволила объективно охарактеризовать вклад активности нейронов стволовых центров в восходящем слуховом пути в формирование реакций на звуковые сигналы. В контрольной группе при действии парных щелчков уровнем 50, 70 и 90 дБ УЗД наибольшей амплитудой отличались II и III волны КСВП, соответствующие суммарной реакции на предъявление акустического стимула нейронов кохлеарных ядер и ядер верхнеоливарного комплекса. Их амплитуда была значимо выше, чем у остальных волн КСВП (т.е. компонентов I, IV и V) ($p < 0,01$, ранговый дисперсионный анализ ANOVA, тест Данна) (рисунок, Д). Такую же картину мы наблюдали и у крыс-гетерозигот DAT-het, в КСВП которых наибольшую амплитуду также имели волны II и III ($p < 0,01$, ранговый дисперсионный анализ ANOVA, тест Данна) (рисунок, Е). С ростом уровня щелчков от 50 до 90 дБ УЗД усредненная по всем животным данной группы амплитуда волны II возрастала от 0,8 до 2,8 мкВ у крыс линии Wistar и от 1,7 до 5,4 мкВ у крыс линии DAT-het; амплитуда пика III увеличивалась от 0,3 до 1,4 мкВ у крыс линии Wistar и от 0,7 до 1,9 мкВ у трансгенных крыс. Таким образом, в обеих группах экспериментальных животных амплитуда II и III компонентов КСВП повышалась с ростом уровня звука от десятых долей до единиц мкВ. Достоверных различий по амплитуде волн II и III между крысами линий Wistar и трансгенными крысами-гетерозиготами при действии звуков уровня 50–90 дБ УЗД, а также по характеру ее изменения с ростом уровня сигнала обнаружено не было ($p > 0,5$) (рисунок, Д, Е).

Амплитуда волны I КСВП у исследованных животных обеих линий была меньше, чем волн II и III. У крыс линии Wistar амплитуда волны I в ответах на парные щелчки возрастала в диапазоне от 0,2 до 0,7 мкВ с увеличением уровня звука от 50 до 90 дБ УЗД. У крыс DAT-het она была значимо выше и составляла 0,6–1,4 мкВ при предъявлении щелчков такого же уровня ($p = 0,00103$, тест Манна-Уитни) (рисунок, Д, Е). Латентности I пика КСВП при этом не различались в обеих группах экспериментальных животных. Таким образом, мы выявили достоверные различия в амплитуде наиболее раннего компонента КСВП у нормальных и трансгенных крыс.

Волны IV и V у крыс обеих линий были наименее выражены. Их средние амплитуды практически не различались как при действии парных щелчков, так и при предъявлении одиночных тонов (рисунок, Д, Е). Так, амплитуда волны IV с повышением уровня щелчков от 50 до 90 дБ УЗД,

увеличивалась от 0,16 до 0,6 мкВ у крыс контрольной группы и от 0,15 до 0,8 мкВ у крыс-гетерозигот (рисунок, Д, Е). Волна V, соответствующая ответу на звуковой стимул нейронов слухового центра среднего мозга, имела наименьшую среднюю амплитуду — с ростом уровня щелчков она возрастала от 0,08 до 0,5 мкВ у крыс линии Wistar и в диапазоне 0,2–0,5 мкВ у крыс DAT-het (рисунок, Д, Е). Значимые различия по амплитудам волн IV и V между крысами разных линий также не были обнаружены.

Обсуждение результатов

Результаты представленного исследования продемонстрировали сходство амплитудных и временных параметров КСВП крыс линии Wistar и трансгенных крыс-гетерозигот DAT-het. Принимая во внимание, что крысы линии Wistar послужили основой для выведения гетерозигот DAT-het, и учитывая результаты поведенческих исследований, не выявивших существенных различий в реакциях крыс-гетерозигот и крыс линии Wistar на изменение окружающей обстановки [20], мы ожидали сходства основных показателей слуховой чувствительности крыс обеих линий. Вместе с тем сравнительный анализ амплитуд волн КСВП крыс линии Wistar и гетерозигот DAT-het выявил значимо большую амплитуду пика I у крыс DAT-het. Этот результат подразумевает различия в формировании периферических реакций на звук у интактных крыс и крыс-гетерозигот, возникающие вследствие разной эффективности функционирования транспортера DAT-1.

На сегодняшний день в кортиевоом органе грызунов показано присутствие клеточных рецепторов к дофамину D1 и D2 [21–23]. У морской свинки D1-рецепторы были обнаружены в мембранах дендритов нейронов спирального ганглия улитки внутреннего уха [21]. Их активация при этом способствовала увеличению амплитуды составных потенциалов действия, регистрируемых от групп волокон в составе слухового нерва, различающихся по скорости проведения нервного импульса [21]. Другое исследование показало снижение амплитуды составных потенциалов действия в условиях введения в перилимфу кортиева органа 1-метил-4-фенил-1,2,3,4-тетрагидропиридина, представляющего из себя нейротоксин, избирательно повреждающий дофаминергические нейроны [24]. Возможно, у крыс-гетерозигот DAT-het, отличающихся сниженной по сравнению с нормой эффективностью функционирования транспортера DAT-1, дофамин, задерживаясь в синаптической щели, способствует усилению реакции волокон слухового нерва на звук, активируя D1-рецепторы. Очевидно, что дофаминергическая регуляция слуховой чувствительности включает также D2-опосредованную нисходящую передачу сигналов к кортиеву органу от стволовых центров слуха через эфферентные

проекции оливокохлеарного пучка [23]. Известно, что активация D2-рецепторов ингибирует аденилатциклазный путь передачи внутриклеточных сигналов, что в физиологическом отношении проявляется в ослаблении ответа волокон слухового нерва на звуковые сигналы [21, 23, 25]. Таким образом, большая по сравнению с нормой амплитуда I компонента КСВП у крыс-гетерозигот, как нам представляется, с малой вероятностью является следствием активации D2-рецепторов. Усиление дофаминергической передачи сигнала через D2-рецепторы должно было бы способствовать снижению амплитуды волны I КСВП у гетерозигот, чего мы не наблюдали. Исследования, проведенные с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, выявили экспрессию в нейронах спирального ганглия улитки D4- и D5-подтипов дофаминовых рецепторов [23]. Тем не менее, у мышей, нокаутированных по генам D3–D5-рецепторов к дофамину, не выявлено изменений амплитуды и порогов компонента I КСВП, а также изменений порогов отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения [23, 26]. Это свидетельствует о том, что опосредованная дофамином модуляция чувствительности к звуковым сигналам на периферии слуховой системы определяется балансом процессов активации и инактивации D1- и D2-рецепторов [23, 26]. D3–D5-подтипы дофаминовых рецепторов, по видимому, не участвуют в модуляции слуховых ответов в кортиевом органе [23].

На сегодняшний день между линиями крыс DAT-het и Wistar обнаружены отдельные поведенческие различия, например, на мотивационном этапе полового поведения [27]. У мышей-гетерозигот по гену *Slc6a3* отмечены худшие по сравнению с интактными животными показатели внимания и гиперреактивность при действии сенсорных сигналов [10]. У интактных крыс, в свою очередь, показан вклад дофаминергической нейротрансмиссии в обработку биологически значимых акустических сигналов и неожиданных звуков одиночными слуховыми нейронами на уровне ствола мозга [28]. Тем не менее, только на основе анализа характеристик КСВП у крыс-гетерозигот представляется затруднительным сделать вывод о коррелятах патологий дофаминергической системы и, в частности, СДВГ, в суммарных реакциях стволовых центров слуха на звуковые сигналы. По видимому, дофамин модулирует реакции слуховых центров более избирательно, чем на периферии, и его влиянию подвержены ответы отдельных групп нейронов, а не всей нейрональной популяции данного слухового центра, что могло бы объяснить отсутствие различий в параметрах волн II–V КСВП, зарегистрированных нами у крыс линий Wistar и DAT-het. Для окончательного ответа на этот вопрос необходимо исследовать слуховую чувствительность животных, у которых

транспортер DAT-1 не функционирует, т.е. гомозигот, нокаутированных по кодирующему его гену. Нам представляется вероятным обнаружить у крыс DAT-ko значимые изменения во временных характеристиках и величине вызванных звуком суммарных реакций центральных слуховых нейронов ствола мозга (т.е. в латентностях и амплитудах волн II–V КСВП). Выявление таких изменений позволит определить степень влияния патологии дофаминергических нейронов на анализ звуковых сигналов слуховыми центрами мозга крыс, а также уровень в восходящем слуховом пути, в наибольшей степени подверженный этому влиянию.

Заключение

Сравнительный анализ характеристик КСВП крыс линии Wistar и трансгенных крыс-гетерозигот DAT-het показал, что у крыс DAT-het волна I КСВП, соответствующая суммарной реакции волокон слухового нерва на звук, имеет большую амплитуду, чем у крыс линии Wistar. Полученные данные позволили предположить, что у гетерозигот, отличающихся сниженной по сравнению с нормой экспрессией гена, кодирующего транспортер дофамина DAT-1, изменяется характер до-

фаминергической передачи в кортиевом органе. По-видимому, это изменение обусловлено дополнительной активацией D1-рецепторов, локализованных на мембранах дендритов нейронов спирального ганглия улитки внутреннего уха, вследствие увеличения концентрации внеклеточного дофамина. В целом, результаты настоящей работы создают предпосылки для дальнейшего исследования слуховой чувствительности крыс-гомозигот (DAT-ko), у которых полностью подавлена экспрессия гена *Slc6a3* и транспортер обратного захвата дофамина DAT-1 не функционирует.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию № 075-00263-25-00. Работа З.С. Фесенко и Е.В. Ефимовой выполнена при поддержке Санкт-Петербургского государственного университета, шифр проекта 117033714. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Комиссией по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН (Протокол № 1-2 от 26.01.2023). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hirsch E.C., Hunot S., Faucheux B., Agid Y., Mizuno Y., Mochizuki H., Tatton W., Tatton N., Olanow W. Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1999;14(2):383–385.
2. Viggiano D., Vallone D., Ruocco L.A., Sadile A.G. Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav. Revs.* 2003; 27(7):683–689.
3. Mehler-Wex C., Riederer P., Gerlach M. Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurotox Res.* 2006;10(3–4):167–179.
4. Zhou Z., Yan Y., Gu H., Sun R., Liao Z. Dopamine in the prefrontal cortex plays multiple roles in the executive function of patients with Parkinson's disease. *Neural Regenerat. Res.* 2024;19(8):1759–1767.
5. Soleimani R., Jalali M.M., Faghieh H.A. Comparing the prevalence of attention deficit hyperactivity disorder in hearing-impaired children with normal-hearing peers. *Arch. Pediatr.* 2020;27(8):432–435.
6. Tsur N., Zloof Y., Rittblat M., Reuven Y., Simchoni M., Derazne E., Yitzchaki Z., Adler L., Shlaifer A., Manuva O., Beer Z. Hearing impairment and severe attention deficit/hyperactivity disorder: A nationwide study. *Otol Neurotol.* 2024;45(3):e142–e146.
7. Leo D., Gainetdinov R.R. Transgenic mouse models for ADHD. *Cell Tissue Res.* 2013;354(1):259–271.
8. Rahi V., Kumar P. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Internatl. J. Develop. Neurosci.* 2021;81(2):107–124.
9. Regan S.L., Hufgard J.R., Pitzer E.M., Sugimoto C., Hu Y.C., Williams M.T., Vorhees C.V. Knockout of latrophilin-3 in Sprague-Dawley rats causes hyperactivity, hyper-reactivity, under-response to amphetamine, and disrupted dopamine markers. *Neurobiol. Disease.* 2019;130:104494.
10. Regan S.L., Williams M.T., Vorhees C.V. Review of rodent models of attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Revs.* 2022;132:621–637.
11. Gainetdinov R.R., Jones S.R., Caron M.G. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knockout mice. *Biol. Psychiatry.* 1999;46(3):303–311.
12. Shen H.-W., Hagino Y., Kobayashi H., Shinohara-Tanaka K., Ikeda K., Yamamoto H., Yamamoto T., Lesch K.-P., Murphy D.L., Hall F.S., Uhl G.R., Sora I. Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by *in vivo* microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacol.* 2004;29(10):1790–1799.
13. Leo D., Sukhanov I., Zoratto F., Illiano P., Caffino L. et al. Pronounced hyperactivity, cognitive dysfunctions, and BDNF dysregulation in dopamine transporter knock-out rats. *J. Neurosci.* 2018;38(8):1959–1972.
14. Lloyd J.T., Yee A.G., Kalligappa P.K., Javed A., Cheung P.Yu., Todd K.L., Karunasinghe R.N., Vlajkovic S.M., Freestone P.S., Lipski J. Dopamine dysregulation and altered responses to drugs affecting dopaminergic transmission in a new dopamine transporter knockout (DAT-KO) rat model. *Neuroscience.* 2022;491:43–64.
15. Lev A., Sohmer H. Sources of averaged neural responses recorded in animal and human subjects during cochlear audiometry (electro-cochleogram). *Arch. Klin. Exp. Ohren. Nasen. Kehlkopfheilkd.* 1972;201(2):79–90.

16. Chiappa K.H., Gladstone K.J., Young R.R. Brain stem auditory evoked responses: studies of waveform variations in 50 normal human subjects. *Arch. Neurol.* 1979;36(2):81–87.
17. Church M.W., Jen K.L.C., Stafferton T., Hotra J.W., Adams B.R. Reduced auditory acuity in rat pups from excess and deficient omega-3 fatty acid consumption by the mother. *Neurotoxicol. Teratol.* 2007;29(2):203–210.
18. Alvarado J.C., Fuentes-Santamaría V., Jareno-Flores T., Blanco J.L., Juiz J.M. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci. Res.* 2012;73(4):302–311.
19. Jafarzadeh S., Pourbakht A. Morphology variations of click-evoked auditory brainstem response with low and high rate stimuli in rat. *Aud. Vestib. Res.* 2018;28(1):22–27.
20. Adinolfi A., Zelli S., Leo D., Carbone C., Mus L., Illiano P., Allea E., Gainetdinov R.R., Adriani W. Behavioral characterization of DAT-KO rats and evidence of asocial-like phenotypes in DAT-HET rats: The potential involvement of norepinephrine system. *Behav Brain Res.* 2019;359:516–527.
21. Niu X., Canlon B. The signal transduction pathway for the dopamine D1 receptor in the guinea-pig cochlea. *Neuroscience.* 2006;137(3):981–990.
22. Darrow K.N., Simons E.J., Dodds L., Liberman M.C. Dopaminergic innervation of the mouse inner ear: evidence for a separate cytochemical group of cochlear efferent fibers. *J. Comp. Neurol.* 2006;498(3):403–414.
23. Maison S.F., Liu X.P., Eatock R.A., Sibley D.R., Grandy D.K., Liberman M.C. Dopaminergic signaling in the cochlea: receptor expression patterns and deletion phenotypes. *J. Neurosci.* 2012;32(1):344–355.
24. Le Prell C.G., Halsey K., Hughes L.F., Dolan D.F., Bledsoe S.C. Disruption of lateral olivocochlear neurons via a dopaminergic neurotoxin depresses sound-evoked auditory nerve activity. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2005;6(1):48–62.
25. Wu J.S., Yi E., Manca M., Javaid H., Lauer A.M., Glowatzki E. Sound exposure dynamically induces dopamine synthesis in cholinergic LOC efferents for feedback to auditory nerve fibers. *Elife.* 2020;9:e52419.
26. Kitcher S.R., Pederson A.M., Weisz C.J. Diverse identities and sites of action of cochlear neurotransmitters. *Hear. Res.* 2022;419:e.108278.
27. Sanna F., Bratzu J., Serra M.P., Leo D., Quartu M., Boi M., Espinoza S., Gainetdinov R.R., Rosaria Melis M., Argiolas A. Altered sexual behavior in dopamine transporter (DAT) knockout male rats: a behavioral, neurochemical and intracerebral microdialysis study. *Frontiers Behav. Neurosci.* 2020;14:58.
28. Valdés-Baizabal C., Carbajal G.V., Pérez-González D., Malmierca, M.S. Dopamine modulates subcortical responses to surprising sounds. *PLoS Biol.* 2020;18(6):e3000744.

Поступила в редакцию 16.04.2025

После доработки 04.08.2025

Принята в печать 02.09.2025

RESEARCH ARTICLE

Comparative study of auditory sensitivity in normal Wistar rats and heterozygous rats with reduced expression of the dopamine transporter (DAT-1) gene

G.D. Khorunzhii^{1,*} , M.A. Egorova¹ , Z.S. Fesenko², E.V. Efimova² 

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Torez Ave. 44, St. Petersburg, 194223, Russia;

²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg State University Institute of Translational Biomedicine, Universitetskaya Emb. 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia

*e-mail: khorunzhii.gd@gmail.com

The comparative electrophysiological study of auditory sensitivity of intact Wistar rats and heterozygous rats of the transgenic DAT-het line with a reduced expression level of the Slc6a3 gene encoding the dopamine reuptake transporter (DAT-1), providing an experimental model of dopaminergic neurons pathology, was performed. The amplitude and time parameters of auditory brainstem responses recorded in rats of both lines under presentation of paired clicks and single tones were analyzed. Generally, the auditory sensitivities of Wistar and DAT-het rats were similar, but a comparative analysis of the amplitudes of auditory brainstem response peaks, obtained from experimental animals, revealed a significantly greater amplitude of peak 1 in DAT-het rats. Thus, the data obtained suggest that DAT-het heterozygotes differ from rats with a normally functioning dopamine reuptake DAT-1 transporter by an increased level of dopaminergic signaling via activation of D1 receptors localized in the membranes of neurons of the cochlea spiral ganglion.

Keywords: rat, dopaminergic system, attention deficit hyperactivity disorder, transgenic animals, hearing, auditory brainstem response

Funding: The research was supported by state budget funds (no. 075-00263-25-00). The work of Z.S. Fesenko and E.V. Efimova was funded by St. Petersburg State University (project no. 117033714).

Сведения об авторах

Хорунжий Глеб Дмитриевич — канд. биол. наук, науч. сотр. группы нейрофизиологических основ механо-рецепторных функций ИЭФБ РАН. Тел.: 8-812-552-32-56; e-mail: khorunzhii.gd@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2650-5619>

Егорова Марина Александровна — канд. биол. наук, руководитель группы нейрофизиологических основ механо-рецепторных функций ИЭФБ РАН. Тел.: 8-812-552-32-56; e-mail: ema6913@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4216-6469>

Фесенко Зоя Сергеевна — мл. науч. сотр. лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ. Тел.: 8-921-630-28-03; e-mail: z.fesenko@spbu.ru

Ефимова Евгения Викторовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины СПбГУ. Тел.: 8-921-630-28-03; e-mail: e.v.efimova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9641-515X>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 574.42

История леса и современная флора Салтыковского лесопарка (ближайшее Подмосковье)

Е.Г. Ершова , В.Е. Пименов* , Н.С. Гамова , М.А. Ершова , Т.П. Ашуркова*¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: v-pimenov01@inbox.ru*

В статье представлены результаты исследования на территории Салтыковского лесопарка, расположенного в зоне плотной городской застройки ближнего Подмосковья. В работе использован комплексный подход, включающий флористические, палеоэкологические и историко-археологические методы. Установлено, что современная флора лесопарка (в границах охраняемой природной территории) отличается высоким видовым разнообразием и сравнительно низкой долей адвентивных видов по сравнению с флорой лесопарков Москвы. На основании спорово-пыльцевого анализа торфяных отложений лесного болота реконструирована история растительности за последние 4200 лет. Выявлены состав и структура коренных широколиственных лесов, периоды сельскохозяйственного освоения территории и возраст формирования современных лесных ценозов. Установлено, что первые признаки хозяйственной деятельности на территории водоразделов относятся к бронзовому веку, а ее максимум датируется XVI–XVIII вв. Старейшая часть лесопарка (кварталы 1, 3 и 4) представляет собой экосистемы, сформировавшиеся в течение последних двух–трех столетий на месте бывших сельскохозяйственных угодий и прошедшие несколько стадий восстановительных сукцессий. В настоящее время по составу флоры и структуре растительности они близки к естественным зональным лесам региона. Исследование подчеркивает важность Салтыковского лесопарка не только как памятника ландшафтной архитектуры, но и как природного резервата, сохраняющего элементы лесных сообществ, характерных для подзоны южной тайги, несмотря на расположение в зоне плотной городской застройки.

Ключевые слова: реконструкция растительности, поздний голоцен, спорово-пыльцевой анализ, биоразнообразие, сельскохозяйственное освоение, торфяные отложения, южная тайга

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-4

Введение

Современные методы палеоэкологии позволяют не только воссоздавать облик коренных растительных сообществ, но и выявлять роль антропогенных факторов в формировании современных фитоценозов [1, 2]. Это дает возможность как прогнозировать состояние экосистем в условиях нестабильного климата и возрастающего антропогенного влияния, так и планировать меры их охраны и восстановления. Особый научный интерес представляют участки лесных экосистем, расположенные в условиях плотной городской застройки. В настоящее время подобные исследования [3, 4] в урбанизированных районах крайне немногочисленны, что подчеркивает актуальность данного направления.

Салтыковский лесопарк — один из немногих сохранившихся участков леса, расположенный

в черте г. Москвы и городов-спутников (Реутов, Балашиха). Помимо территории старинного парка, выделенного как памятник ландшафтной архитектуры XVII–XIX вв., прилегающий к нему лесной массив представляет высокую научную ценность как фрагмент естественной лесной растительности. Парк и участки леса, выделенные в особо охраняемую природную территорию (ООПТ) «Старинный парк и кварталы 1, 3, 4, 9 Салтыковского участка Балашихинского лесопарка», отличаются богатством флоры и фауны, имеют собственную историю, уходящую вглубь веков, и уже более 100 лет служат популярным местом отдыха жителей Москвы и Подмосковья.

Научные исследования лесопарка немногочисленны. Исторические сведения о парке представлены в единственной опубликованной исторической работе краеведа Н.И. Артемьева [5],

в которой собраны материалы по истории поселка, княжеской усадьбы и парка, а современная растительность и фауна кратко описаны в паспорте ООПТ [6]. Однако современное состояние флоры и история развития лесного массива ранее не были изучены. Целью настоящего исследования стал комплексный анализ флоры и истории растительности Салтыковского лесопарка, включающий описание видового состава в границах Памятника природы, реконструкцию динамики лесных фитоценозов на водоразделе и оценку влияния древних поселений на развитие лесных экосистем.

Материалы и методы

Салтыковский лесопарк расположен в ближайшем Подмоскovie, восточнее Московской кольцевой автодороги (МКАД), южнее станции Салтыковская Горьковского направления железной дороги. С юга он граничит с московскими микрорайонами Косино и Кожухово, а с запада — с райо-

ном Новокосино. Лесопарк имеет общую площадь 10,12 км²; он включает несколько отдельных массивов с различной административной принадлежностью, природоохранным статусом и историей. К наиболее старым и хорошо сохранившимся участкам лесопарка относится Памятник природы областного значения «Старинный парк и кварталы 1, 3, 4, 9 Салтыковского участка Балашихинского лесопарка», учрежденный Правительством Московской области от 20.04.2017 г. [6]. ООПТ была создана для охраны ценных в экологическом, научном и эстетическом отношении природно-антропогенных комплексов, старовозрастных хвойно-широколиственных, хвойных и черноольховых лесов; мест произрастания и обитания охраняемых и иных редких видов растений, грибов и животных. ООПТ имеет площадь 2,43 км², включает кварталы 1, 3 (частично), 4, 9 Салтыковского участкового лесничества и старинный парк усадьбы Никольское-Архангельское с каскадом прудов на р. Чечере (рис. 1).

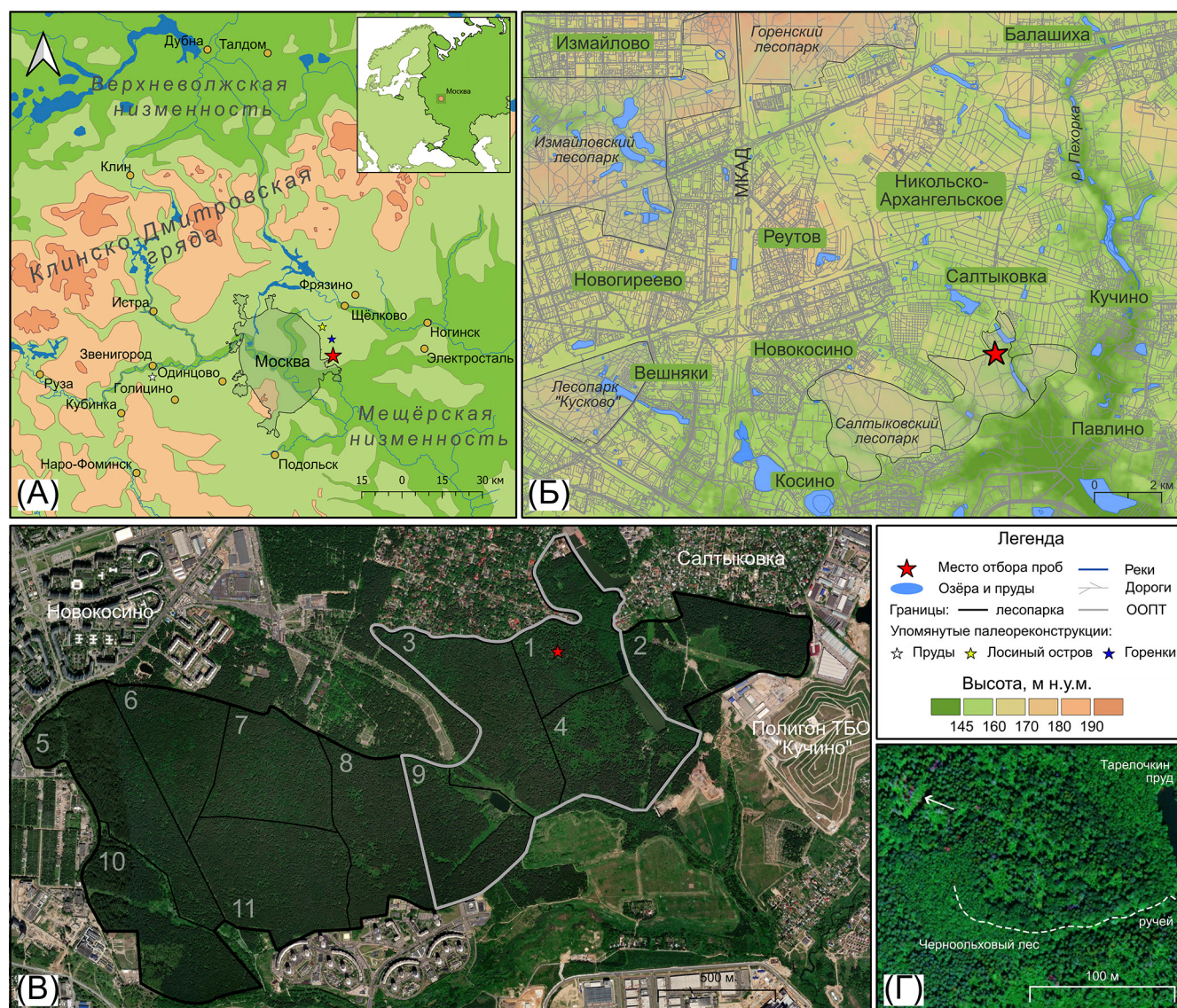


Рис. 1. Схема расположения Салтыковского лесопарка. А — на карте Восточно-Европейской равнины, Б — относительно г. Москвы и городов спутников, В — схема лесопарка на космоснимке ESRI, Г — расположение изученного болота на космоснимке ESRI, болото указано серой стрелкой.

Лесопарк расположен на волнистых и слабо-волнистых участках моренно-водно-ледниковой равнины, пересеченной долинами р. Чечеры (правого притока р. Пехорки) и ее притоков. Ширина долины достигает 200 м, пойма шириной 70–80 м частично заболочена. Почвенный покров представлен суглинистыми дерново-подзолистыми почвами на водоразделе и дерново-подзолистыми глеевыми и торфянисто-глеевыми — по долинам рек и ручьев [6]. Растительность ООПТ представлена старовозрастными хвойными и хвойно-широколиственными лесами, лугами и заболоченными высокотравными черноольшаниками в долинах ручьев и рек, прибрежными сообществами вокруг прудов и рудеральными сообществами в наиболее посещаемых местах отдыха. В старинном парке сохранились липовые, березовые и сосновые аллеи; диаметр стволов старых лип достигает 60 см, сосен — до 90 см. В южной части лесопарка, в том числе в квартале 9, преобладают более молодые сосново-березовые леса с примесью ели и дуба, флористическое разнообразие подчиненных ярусов меньше, чем в северной части, в травяном ярусе больше бореальных видов [6].

Исследование флоры. Составление аннотированного списка флоры 1, 2, 3 и 4 кварталов лесопарка, три из которых вошли в состав Памятника природы, происходило в 2012–2021 гг. во время пеших маршрутов, выбранных таким образом, чтобы обойти всю территорию и все экотопы. При этом учитывались все встречающиеся сосудистые растения на территории Памятника природы. Растения и эколого-фитоценотические группы определяли по [7], жизненные формы — по [8], адвентивные виды и их характеристики даны по [9]. Для сравнения были использованы материалы по флоре Звенигородской биостанции [10] и городу Москве [9]. В качестве дополнительного источника данных использованы материалы платформы iNaturalist в границах парка и ООПТ.

Реконструкция растительности. Развитие лесной растительности было реконструировано на основе спорово-пыльцевого анализа торфяных отложений, отобранных из злаково-сфагново-осокового болота низинного типа. Болото расположено в наименее подверженной антропогенным воздействиям части леса, вблизи истока ручья Ведеринка, впадающего в реку Чечеру (55.73985° N, 37.92009° E, абсолютная высота — 149 м над уровнем моря). Болото имеет почти правильную округлую форму, его размер 64 × 50 м (рис. 1).

Вокруг места отбора проб произрастает старовозрастный елово-широколиственный лес из ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) H. Karst.), дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), клена остролистного (*Acer platanoides* L.) и липы мелколистной (*Tilia cordata* Mill.) с хорошо выраженным подлеском из лещины обыкновенной (*Corylus avellana* L.). Травяной ярус образован видами, типичными для

широколиственных и смешанных лесов (снять обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.), осока волосистая (*Carex pilosa* Scop.), живучка ползучая (*Ajuga reptans* L.), ожика волосистая (*Luzula pilosa* (L.) Willd.), кислица обыкновенная (*Oxalis acetosella* L.), недотрога мелкоцветковая (*Impatiens parviflora* DC.), будра плющевидная (*Glechoma hederacea* L.), мицелис стенной (*Mycelis muralis* (L.) Dumort.). В 100 м к югу от болота произрастает черноольховый лес, который узкой полосой тянется вдоль ручья до его впадения в реку Чечеру. Образцы для анализа были отобраны с помощью торфяного бура с диаметром пробоотборника 2 см. Всего было проанализировано 40 образцов торфа с шагом 2 см. Для построения диаграмм использовали программу Tilia 2.6.1 [11].

Для определения возраста отложений использовали радиоуглеродные даты, полученные методом ускорительной масс-спектрометрии в лаборатории университета Оттавы (Канада). Даты калибровали с помощью калибровочной кривой IntCal20, разработанной для материковых отложений северного полушария [12]. Для создания модели торфонакопления использовали пакет 'rbacon' в среде R [13].

Результаты

Анализ исторических карт и краеведческих источников позволил установить, что территория ООПТ представляет собой фрагмент древнего лесного массива: часть его не подвергалась вырубкам, как минимум, с XVI в., другая же сформировалась на месте полей, заросших лесом в конце XVIII в. или после Отечественной войны 1812 г.. Полный текст анализа приведен в Приложении.

Современная флора. В результате флористического обследования был составлен аннотированный список флоры Салтыковского лесопарка в пределах Памятника природы (Приложение). Всего было выявлено 472 вида дикорастущих, дичающих и заносных сосудистых растений из 81 семейства. На диаграмме (рис. 2) представлены 13 преобладающих семейств. Не выявлено преобладание какого-либо одного семейства, а к числу наиболее представленных относились Asteraceae, Poaceae, Rosaceae, Caryophyllaceae, Fabaceae, Brassicaceae, т.е. семейства, характерные для зоны подтайги [10]. Во флоре лесопарка обнаружен один вид, занесенный в Красную книгу Московской области — пальчатокоренник майский (*Dactylorhiza majalis* subsp. *baltica* (Klinge) H.Sund.) [14] — и 32 вида, относящиеся к редким и охраняемым видам города Москвы [15].

Эколого-фитоценотический состав (рис. 2) не совсем обычен: лесные растения не абсолютные доминанты во флоре лесопарка, что связано с наличием лугов, низинных болот, водоемов, опушек и рудеральных местообитаний. Кроме того, есть участки старого парка, где сохранились культиви-

руемые виды. В составе жизненных форм (рис. 2) доминируют гемикриптофиты и терофиты, что характерно для подзоны смешанных лесов [10]. Флорогенетический анализ показал, что, несмотря на наличие ландшафтного парка и нарушенных местообитаний, заносные (адвентивные) виды составляют только 19,7% флоры (93 вид из 472), что соответствует средним значениям для подмосковных лесов [8, 10]. Это значительно отличает Салтыковский лесопарк от парков Москвы, где на заносные виды приходится до 50% флоры [9]. Подобные отличия могут служить дополнительным подтверждением хорошей сохранности растительных сообществ Салтыковского лесопарка.

Среди заносных видов во флоре парка преобладают (82,8%) кенофиты, т.е. растения, занесенные после XVI в. По способу заноса эргазиофиты (занесенные преднамеренно) преобладают (55,9% против 44,1%) над ксенофитами (занесенные непреднамеренно), что также сильно отличает Салтыковский лесопарк от лесопарков Москвы. В адвентивной флоре Салтыковского лесопарка доминируют эпектофиты (33,3%) и агриофиты (32,2%), т.е. виды, агрессивно распространяющиеся на нарушенных территориях и в естественных сообществах, в отличие от Москвы, во флоре которой преобладают виды слабо натурализованные — эфемерофиты и колонофиты [9].

Спорово-пыльцевой анализ. Для реконструкции более древней истории этой наименее нарушенной части леса было выбрано небольшое лесное болото в первом квартале лесопарка. Глубина торфяных отложений болота составила 100 см. В основании (95–98 см) лежал слой гумусированного суглинка с углем, который был перекрыт сильно разложившимся темно-серым низинным торфом (58–95 см), обогащенным минеральной фракцией. Выше 58 см отложения были представлены среднеразложившимся бурым низинным торфом. Хронология изученной колонки торфяных отложений построена на основании двух радиоуглеродных дат с учетом

следов перерыва в торфонакоплении на уровне 58 см (таблица, рис. 3, Приложение). Согласно модели, начало торфообразования относится к периоду 3700–4500 л.н. (здесь и далее возраст указан в калиброванных годах от 1950 г.). До 2750 л.н. торф накапливался со скоростью 0,2 мм в год, с 800 л.н. по настоящее время накопление торфа шло непрерывно со скоростью около 0,7 мм в год (Приложение). В период с 2750 по 800 л.н. установлен перерыв в торфонакоплении.

Таблица

Результаты радиоуглеродного датирования

№	Лабораторный номер	Глубина, м	Материал	¹⁴ C-возраст, л. н.	Калиброванный возраст, л.н. (±1σ)
1	UOC-14544	26	Торф	302 ± 32	380 ± 50
2	UOC-14545	67	Торф	3039 ± 32	3250 ± 60

Результаты спорово-пыльцевого анализа представлены на сокращенной диаграмме (рис. 3). Мы выделили на ней пять локальных пыльцевых зон. Полная спорово-пыльцевая диаграмма приведена в Приложении.

Зона 1 (98–77 см, 4200–3700 л.н.). Древесные таксоны составляют 70–80% спектров, при этом доминируют широколиственные породы (*Tilia*, *Quercus*, *Ulmus*, *Acer*, *Fraxinus*), в сумме они достигают 60%, в то время как хвойные (*Picea*, *Pinus*) и остальные древесные — менее 30%. Из трав высокая доля пыльцы осоковых (до 30%), присутствуют *Onagraceae*, *Chenopodium*-type, *Artemisia*, *Brassicaceae*, *Asteraceae*.

Зона 2 (77–58 см, 3700–2750 л.н.). Древесные составляют 80–85%, широколиственные породы также доминируют (в сумме 60%), особенно дуб (20%). Участие хвойных минимально (менее 10% в сумме), возрастает доля березы (15%). Среди трав, помимо осок, много других таксонов, характерных для переувлажненных местообитаний (*Comarum*, *Alisma*, *Sparganium*, *Menyanthes*, *Calla*,

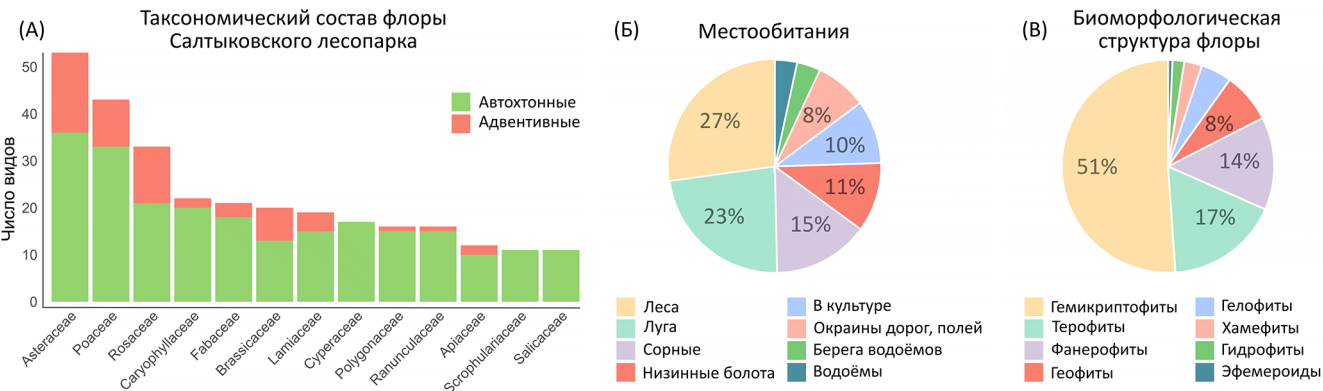


Рис. 2. Результаты анализа флоры Салтыковского лесопарка. А — таксономический состав (представлены только первые 13 семейств по числу видов), Б — эколого-фитоценологический состав, В — биоморфологический состав. Полный аннотированный список флоры представлен в Приложении.

Typha), а также таксонов, считающихся индикаторами сельскохозяйственной деятельности (культурные злаки, *Artemisia*, *Chenopodium*-type). Высока доля пыльцы луговых трав, которые на водоразделах в лесной зоне можно считать индикаторами осветления леса (*Caryophyllaceae*, *Ariaceae*, *Filipendula*, *Ranunculus*, *Galium*).

Зона 3 (58–35 см, 800–500 л.н.) характеризуется резкими отличиями в составе пыльцевых спектров по сравнению с предыдущей зоной. Участие пыльцы древесных максимально (95–99%), доминирует береза (50–60%), широколиственные породы в сумме составляют около 20%, невелика доля ели (8–15%), пыльца сосны отсутствует. Для зоны 3 характерно минимальное разнообразие трав, почти нет болотных таксонов, луговые травы встречаются единично, а антропогенные индикаторы практически отсутствуют. Появляются споры *Sphagnum* (до 10% от суммы пыльцы и спор).

Зона 4 (35–15 см, 500–200 л.н.). Доля древесных в пыльцевых спектрах резко сокращается до 70–75%, состав спектров также резко меняется: процент березы уменьшается до 40–50%, почти исчезают ель и все широколиственные породы, кроме дуба (около 5%), одновременно появляется сосна (10–20%) и ива (до 5%). Состав трав разнообразен, доминируют злаки и осоки, многочисленны таксоны-индикаторы земледелия: культурные злаки, включая рожь и пшеницу, гречиха, крестоцветные; много таксонов, типичных для нарушенных местообитаний и лугов.

Зона 5 (15–0 см, последние 200 лет). Доля древесных снова возрастает до 90–95%. Доминирует береза (40–60%), сосна составляет 15–20%, возрастает доля ели (до 15%). Сохраняется небольшая примесь дуба, ольхи и лещины. Сокращается участие таксонов-индикаторов земледелия, но сохраняются таксоны-индикаторы нарушений и осветления леса; возрастает доля спор сфагновых мхов. Самый верхний, поверхностный, спектр сильно отличается от других. В нем доля древесных достигает 98%, при этом ель, сосна и береза составляют по 30%, а доля лещины увеличивается до 5%. Полностью исчезают индикаторы сельского хозяйства и нарушений древесного полога.

Обсуждение

Исследование флоры Салтыковского лесопарка показало, что она характеризуется высокой видовой насыщенностью: на территории площадью 2,43 км² зафиксировано 472 вида сосудистых растений из 81 семейства, а также 32 вида, включенных в Красную книгу города Москвы и один вид – в Красную книгу Московской области [14, 15]. По оценке таксономического богатства флор Восточной Европы, для региона исследования богатство локальных флор составляет 700–800 видов [16]. По таксономическому, биоморфному и эколого-фитоценотическому составу флора парка типична для подзоны смешанных лесов (южной тайги) лесной зоны европейской части России, что подтверждается сравнением с другими ООПТ Подмоскovie [8].

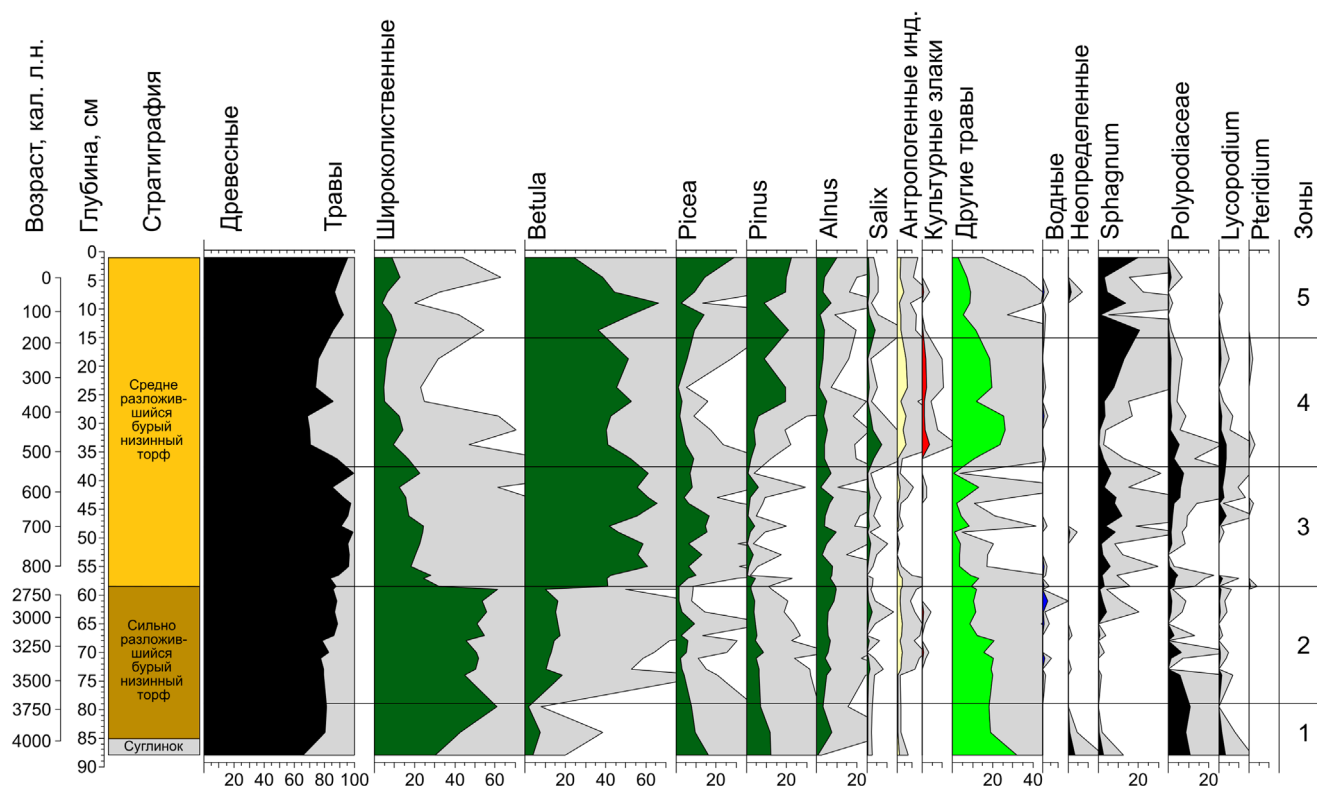


Рис. 3. Сокращенная спорово-пыльцевая диаграмма болотных отложений лесного болота в 1 кв. Салтыковского лесопарка. Калиброванный возраст – от 1950 г.

Адвентивные виды составляют лишь 19,7 % флоры, причем преобладают хорошо натурализованные формы — эпекофиты и агриофиты. Это позволяет рассматривать охраняемые кварталы лесопарка как репрезентативный фрагмент подмосковных лесных экосистем с богатым набором видов, характерных для подзоны южной тайги, многие из которых в последние десятилетия уже стали редкими в Москве и ближайшем Подмоскowie. Однако насколько современные сообщества схожи с фитоценозами прошлого?

В качестве архивов палеоэкологической информации, позволяющих реконструировать историю растительности, принято использовать водораздельные верховые и переходные торфяники без сомкнутого древесного яруса. Однако в силу геоморфологических особенностей и состава почв на территории Салтыковского лесопарка такие болота отсутствуют. Чтобы реконструировать историю водораздельной растительности, мы выбрали маленькое лесное эвтрофное болото на водоразделе. Такие небольшие лесные болота (в англоязычной литературе *forest holes*) рассматриваются как идеальные объекты для реконструкции истории конкретных участков леса, так как в их отложениях накапливается пыльца растений, растущих в радиусе десятков и сотен метров [17].

Данные спорово-пыльцевого анализа отложений лесного болота демонстрируют, что современный состав леса, по крайней мере в пределах исследуемого участка, сформировался относительно недавно. Пыльцевые спектры из верхней части колонки отражают развитие хвойно-широколиственного леса, при этом в поверхностном образце максимальную долю составляет пыльца ели. Учитывая разную пыльцевую продуктивность и дальность распространения пыльцевых зерен отдельных пород это соответствует текущей структуре хвойно-широколиственного леса вокруг места отбора проб. Но еще 100–150 л.н. это был вторичный березовый лес с большим количеством открытых участков, дорог и полей. Об этом свидетельствуют доминирование березы и присутствие многочисленных рудеральных и луговых таксонов в верхних слоях торфяных отложений, а также картографические данные 1930-х гг. (Приложение). В более ранний период, 500–200 л.н. (т.е. в XVI–XVIII вв.), вокруг болота находились поля, на которых выращивали пшеницу, рожь, гречиху и другие культуры. Это согласуется с картами середины XVIII века, на которых, кроме села Никольского и усадьбы Долгоруковых, присутствует еще несколько маленьких поселений и полей на берегах реки Чечеры (Фенинки) к югу и востоку от Желтого пруда (Приложение). Исследование пыльцы подтверждает, что эти поселения возникли здесь задолго до середины XVIII в. Образец торфа с признака-

ми самого начала земледелия (резкое сокращение пыльцы деревьев, появление пыльцы культурных растений и сорняков) имеет радиоуглеродную дату 302 ± 32 ^{14}C -лет, что при калибровке дает интервал 1521–1644 гг. В этот же период в спорово-пыльцевых спектрах возрастает участие сосны, что может быть связано как с естественным зарастанием части полей, так и с преднамеренным высаживанием деревьев на территории поместья. Таким образом, можно утверждать, что князья Долгоруковы в 1660-х гг. начали строить парк и усадьбу не среди густого леса, а на весьма освоенной территории, и вплоть до начала XIX в. к югу и к востоку от парка возделывались поля. Вероятно, часть этих полей была заброшена во время разорения 1812 г. Также возможно, что угодья были оставлены еще раньше; к сожалению, исторические карты не дают ясного ответа на этот вопрос. На спорово-пыльцевой диаграмме зарастание полей соответствует периоду приблизительно 200 л.н., то есть второй половине XVIII в.

До формирования поселений в XVI в. лесной покров первого квартала был представлен не коренными елово-широколиственными лесами, а вторичными березняками с небольшой долей ели и широколиственных пород. Возможно, что пыльцевые спектры отражают восстановительные сукцессии, которые шли в XIII–XV вв. на месте коренных лесов, нарушенных еще раньше — предположительно, в результате деятельности раннеславянских племен, обитавших в долине реки Пехорки и оставивших многочисленные курганные группы. Одна из таких групп, исследованная А.Л. Монгайтом [18], находилась примерно в 1 км, а следы поселения того же времени, найденные краеведами [5], — в 600 м от места отбора проб. Не исключено, что поселений было больше, но они остались неизвестными, так как профессиональных археологических разведок на территории лесопарка не проводилось.

В качестве гипотезы можно предположить, что жители раннеславянских поселений могли использовать исследуемое водораздельное болото как источник воды, углубив его и соорудив запруды. Подобная практика зафиксирована в нашем исследовании под Звенигородом [19]. Такая гипотеза могла бы объяснить как перерыв в торфонакоплении между 2750 и 800 л.н. (утрата слоя торфа при углублении), так и его резкое ускорение после 800 л.н. (повышение уровня воды за счет запруды). При интерпретации перерыва в торфонакоплении можно выдвинуть и альтернативную гипотезу о влиянии климатических изменений. Данные палеопочвоведения [23] свидетельствуют о том, что в период 2000–700 л.н. долина Москвы-реки не затопливалась из-за малого количества осадков. Около 800 л.н. произошло резкое увеличение стока. Следовательно, причиной выявлен-

ного перерыва в исследуемом разрезе могло быть не только изъятие части торфа, вероятность чего нельзя исключать, но и изменения климата на границе суббореального и субатлантического периодов.

Интересен результат анализа нижних слоев торфа, датированных периодом 2750–4500 л.н. Спектры этих отложений кардинально отличаются от спектров последнего тысячелетия: в них очень мало пыльцы хвойных пород, особенно сосны, для которой в силу ее высокой пыльцевой продуктивности значение 5–7% означает фактическое отсутствие. В спектрах доминирует пыльца неморальных видов. Эти данные указывают, что в суббореальном периоде (5700–2600 л.н.) на водоразделе вокруг болота росли широколиственные леса с доминированием дуба. Болото было открытым и сильно обводненным, на нем росли осоки и разнообразные водные и болотные травы. Интересно также, что в период 3300–3000 л.н., т.е. в позднем бронзовом веке, в окрестностях болота, вероятно, жили люди — на это указывает пыльца культурных злаков, включая пшеницу, и луговых таксонов, которые в лесной зоне обычно свидетельствуют о выпасе. Археологически подтвердить это пока невозможно: исследований в этом районе не проводилось.

Выявленные изменения растительности соотносятся с аналогичными реконструкциями, выполненными для близлежащих объектов — Горенского лесопарка [4] и национального парка «Лосиный остров» [3] (рис. 1). Наличие угля и пыльцы постпирогенных таксонов (*Onagraceae*, *Pteridium*) в нижних слоях торфяной залежи болота в Салтыковском лесопарке указывает на связь начала заболачивания с пожарами и изменением гидрологического режима. В болоте Горенки начало торфообразования относится к тому же периоду (приблизительно 4500 л.н.) и тоже связано с пожарами и изменением гидрологии [4]. Региональный масштаб климатических событий, инициировавших торфонакопление на болотах, подтверждается данными из других регионов Восточно-Европейской равнины [20–23]. Для всех трех объектов реконструировано господство широколиственных пород в суббореальном периоде голоцена и их замещение елово-широколиственными в субатлантическом (после 2500 л.н.). Во всех колонках было зафиксировано несколько эпизодов резких изменений в растительном покрове, связанных с хозяйственной деятельностью. Наиболее выраженные — начало славянского освоения в XI–XIII вв. и максимум распахивания в XV–XVIII вв. В то же время реконструкции для Горенского лесопарка и «Лосиног острова», в силу размера изученных болот, в большей степени представляют собой отражение региональной растительности. Болото в Салтыковском лесопарке сохранило информацию

узколокального масштаба. Это позволило более детально реконструировать историю конкретного участка леса, его вырубку в XV в., последующие восстановительные сукцессии XVII в. и даже следы поселения бронзового века, неразличимые на региональном уровне.

Заключение

Несмотря на расположение Салтыковского лесопарка в зоне плотной городской застройки и значительного антропогенного воздействия, флора ООПТ по структуре и составу в большей степени соответствует природным лесным массивам Подмоскovie, чем урбанизированным городским лесным зонам. Это подчеркивает его ценность как резервата аборигенной флоры и важного элемента сохранения биоразнообразия. Наиболее древняя часть территории (кварталы 1, 3 и 4) представляет собой лесные экосистемы, сформировавшиеся в течение последних 200–300 лет на месте заброшенных сельскохозяйственных угодий. Эти сообщества прошли несколько последовательных стадий восстановительных сукцессий и в настоящее время по структуре и флористическому составу близки к естественным зональным лесам региона.

Спорово-пыльцевой анализ облесенного водораздельного болота позволил реконструировать сложную динамику растительного покрова. Болото сформировалось около 4200 л.н., в период господства широколиственных лесов на водоразделах (преимущественно из дуба и липы). Уже в позднем бронзовом веке (3300–3000 л.н.) зафиксированы первые следы воздействия человека. Существенные этапы антропогенного преобразования приходятся на раннее средневековье (около 800 л.н.) и особенно на XVI–XVIII вв., когда территория на месте вырубленных лесов была использована под поля или выпас.

Полученные данные подчеркивают значение водораздельных лесных болот как палеоархивов изменений плакорной растительности и демонстрируют высокую информативность комплексного подхода, объединяющего палеоэкологические и историко-археологические данные. В условиях урбанизации и трансформации экосистем такие исследования особенно актуальны: они позволяют оценить степень нарушенности природных сообществ и определить «отправную точку» для их восстановления.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-14-00065). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Приложение к статье доступно на сайте журнала и в репозитории (<https://doi.org/10.5281/zenodo.17640522>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindbladh M., Fraver S., Edvardsson J., Felton A. Past forest composition, structures and processes – How paleoecology can contribute to forest conservation. *Biol. Conserv.* 2013;168:116–127.
2. Piovesan G., Mercuri A.M., Mensing S.A. The potential of paleoecology for functional forest restoration planning: lessons from Late Holocene Italian pollen records. *Plant Biosyst.* 2018;152(3):508–514.
3. Miagkaia A., Ershova E. A 10 000-year pollen and plant macrofossil record from the Losiny Ostrov National Park (Moscow, Russia). *IOP. C. Ser. Earth. Env.* 2020;438(1):012018.
4. Mazei Y.A., Tsyganov A.N., Ershova E.G., et al. Multi-proxy paleoecological reconstruction of peatland initiation, development and restoration in an urban area (Moscow, Russia). *Diversity.* 2023;15(3):448.
5. Артемьев Н.И. *Салтыковка: прошлое и настоящее, природа и люди.* М.: Отечество; 1995. 144 с.
6. Деревенец Е.Н., Липатов Д.Н. Экологическое состояние фитоценозов и почв в Салтыковском лесопарке города Балашихи Московской области. *Проблемы трансформации естественных ландшафтов в результате антропогенной деятельности и пути их решения.* Ред. И.С. Белюченко. Краснодар: КубГАУ; 2021:438–440.
7. Губанов И.А., Киселева К.В., Новиков В.С., Тихомиров В.Н. *Определитель сосудистых растений центра европейской России.* 2-е изд., доп. и перераб. М.: Аргус; 1995. 558 с.
8. Алексеев Ю.Е., Жмылев П.Ю., Карпухина Е.А. Флора сосудистых растений Звенигородской биостанции Московского университета и ее окрестностей. *Руководство по летней учебной практике студентов-биологов на Звенигородской биостанции им. С.Н. Скадовского.* Под ред. В.М. Гаврилова. М.: Издательство МГУ; 2011:157–229.
9. Майоров С.Р., Бочкин В.Д., Насимович Ю.А., Шербаков А.В. *Адвентивная флора Москвы и Московской области.* М.: Тов-во научн. изд. КМК; 2012. 384 с.
10. Станис Е.В., Карпухина Е.А., Огородникова Е.Н., Жмылев П.Ю. *Природные экосистемы средней полосы России. Учебно-методическое пособие по проведению учебной практики для студентов экологических специальностей.* М.: Энергия; 2007. 224 с.
11. Grimm E.C. TILIA and TILIA.GRAPH: PC spreadsheet and graphics software for pollen data. *INQUA-Commission for the Study of the Holocene, Working-Group on Data-Handling Methods, Newsletter.* 1990;4:5–7.
12. Reimer P.J., Austin W.E.N., Bard E., et al. The IntCal20 northern hemisphere radiocarbon age calibration curve (0–55 cal kBP). *Radiocarbon.* 2020;62(4):725–757.
13. Blaauw M., Christen J.A. Flexible paleoclimate age-depth models using an autoregressive gamma process. *Bayesian Anal.* 2011;6(3):457–474.
14. Варлыгина Т.И., Зубакин В.А., Никитский Н.Б., Свиридов А.В. *Красная книга Московской области.* М.О.: ПФ Верховье; 2018. 810 с.
15. *Красная книга города Москвы.* Под ред. Н.А. Соболева. М.; 2022. 848 с.
16. Морозова О.В. *Таксономическое богатство флоры Восточной Европы: факторы пространственной дифференциации.* М.: Наука; 2008. 328 с.
17. Overballe-Petersen M.V., Bradshaw R.H.W. The selection of small forest hollows for pollen analysis in boreal and temperate forest regions. *Palynology.* 2011;35(1):146–153.
18. Монгайт А.Л. Салтыковские курганы. *Материалы и исследования по археологии СССР. Материалы и исследования по археологии Москвы, т. I.* Под ред. А.В. Арциховского. М.; Л.: Изд-во Акад. наук СССР; 1947:82–87.
19. Krivokorin I.G., Ershova E.G. Paleoecological studies of medieval ponds of MSU Zvenigorod biological station (Moscow Region). *Ecology of ancient and traditional societies, vol. 6.* Eds. N.P. Matveeva and N.E. Ryabogina. Tyumen: Tyumen Scientific Centre SB RAS; 2020:120–123.
20. Novenko E.Yu., Mazei N.G., Kupriyanov D.A., Kusilman M.V., Olchev A.V. Peatland initiation in Central European Russia during the Holocene: Effect of climate conditions and fires. *Holocene.* 2021;31(4):545–555.
21. Panin A.V., Adamiec G., Arslanov K.A., Bronnikova M.A., Filippov V.V., Sheremetskaya E.D., Zaretskaya N.E., Zazovskaya E.P. Absolute chronology of fluvial events in the Upper Dnieper River system and its palaeogeographic implications. *Geochronometria.* 2014;41(3):278–293.
22. Panin A., Matlakhova E. Fluvial chronology in the East European Plain over the last 20 ka and its palaeohydrological implications. *Catena.* 2015;130:46–61.
23. Alexandrovskiy A., Ershova E., Ponomarenko E., Krenke N., Skripkin V. Floodplain paleosols of Moskva River basin: Chronology and paleoenvironment. *Radiocarbon.* 2018;60(4):1169–1184.

Поступила в редакцию 30.04.2025

После доработки 04.09.2025

Принята в печать 12.09.2025

RESEARCH ARTICLE

Forest history and modern flora of the Saltykovsky Forest Park (Moscow suburbs)

E.G. Ershova , V.E. Pimenov* , N.S. Gamova , M.A. Ershova , T.P. Ashurkova

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

*e-mail: v-pimenov01@inbox.ru

This article provides a comprehensive study conducted within the Saltykovsky Forest Park, located in a densely urbanised zone east of Moscow. We applied multidisciplinary approach that combines methods of vegetation science, palaeoecology, and historical ecology. Our results indicate that the current flora within the protected natural area exhibits high species richness and

contains a relatively low proportion of non-native (adventive) species compared to urban forests in Moscow. Pollen analysis of peat cores extracted from a forest mire enabled the reconstruction of vegetation dynamics spanning the last 4,200 years. The study identified the composition and structure of primary broadleaf forests, phases of agricultural land use, and the period of present-day forests formation. Evidence suggests that initial human activity in the watershed dates back to the Bronze Age, with intensive land use peaking between the 16th and 18th centuries. The oldest part of the park (sectors 1, 3, and 4) encompass ecosystems that have developed over the past 200–300 years on former agricultural land and have undergone multiple stages of ecological succession. Currently, their floristic characteristics closely resemble those of undisturbed zonal forest communities typical of the region. This research underscores the ecological and cultural value of the Saltykovsky Forest Park, recognising it not only as a historic landscape feature but also as a biodiversity refuge that conserves remnants of forest communities typical of the southern taiga zone, despite being embedded in an urban area.

Keywords: *vegetation reconstruction, late Holocene, pollen analysis, biodiversity, agricultural expansion, peat sediments, southern taiga*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project 24-14-00065.

Сведения об авторах

Ершова Екатерина Георгиевна — канд. биол. наук, доц. кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-31-65; e-mail: ekaterinagershova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5421-9572>

Пименов Валерий Евгеньевич — мл. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии, аспирант кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-3165; e-mail: v-pimenov01@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1428-5185>

Гамова Наталья Сергеевна — инженер-лаборант кафедры экологии и географии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-3165; e-mail: bg_natagamova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4141-757X>

Ершова Мария Алексеевна — выпускница кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-3165; e-mail: ma.ershova0302@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7836-6403>

Ашуркова Татьяна Павловна — выпускница кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-3165; e-mail: t.p.ashurkova@gmail.com

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.32/.36+576.31+576.3.08

Активность белка-транспортера Р-gr в макрофагах человека усиливает эффект легочного сурфактанта как активатора фагоцитоза

Е.К. Тарасова¹ , Л.Н. Лепеха¹ , А.Г. Масютин^{1, 2} ,
Е.А. Щербакова¹ , М.В. Ерохина^{1, 2, *}

¹Отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Россия, 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: masha.erokhina@gmail.com

Легочный сурфактант — необходимый компонент респираторного отдела для реализации фагоцитоза альвеолярными макрофагами. Туберкулез легких сопровождается снижением выработки легочного сурфактанта и фагоцитарной функции макрофагов. Белок-транспортер Р-gr (ген *ABCB1*) высокоэкспрессирован в клетках легких, экспортирует из них многочисленные субстраты. Встраивание Р-gr в плазматическую мембрану изменяет ее характеристики. Целью настоящей работы стал анализ взаимосвязи между Р-gr и фагоцитарной активностью макрофагов при воздействии экзогенного легочного сурфактанта. В работе применяли методы сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), а также две модели, использующие культивируемые клетки человека: (1) провоспалительные макрофаги ТНР-1 (Р-gr⁺), инфицированные *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) (данная модель при действии сурфактанта рассматривается как модель альвеолярно-подобных макрофагов); (2) родительские клетки миелобластной лейкемии K562 (Р-gr⁻) и клетки K562/i-S9 (Р-gr⁺) с трансфицированным геном *ABCB1*, индуцированные к адгезии. На модели 1 выявлено, что добавление 1 мг/мл экзогенного легочного сурфактанта на 1 ч приводит к формированию многочисленных длинных филоподий, раффов и фагоцитарных чаш, возрастанию фагоцитарного индекса в 1,7 раза. Это демонстрирует, что препарат сурфактанта является эффективным активатором фагоцитоза при инфицировании макрофагов. На модели 2 показано, что в присутствии Р-gr значительно возрастает поверхностная активность клеток под действием экзогенного легочного сурфактанта, по сравнению с клетками без Р-gr. Предполагается, что за счет взаимодействия между Р-gr, белками комплекса ERM (эзрин, радиксин, моэзин) и актиновыми филаментами, клетки Р-gr⁺ более подвержены активации клеточной поверхности и фагоцитозу, чем клетки Р-gr⁻. В дальнейшем анализ особенностей реализации фагоцитоза инфицированными макрофагами в зависимости от активности Р-gr может способствовать разработке новых препаратов, направленных на регуляцию фагоцитарной активности макрофагов.

Ключевые слова: туберкулез, Р-гликопротеин, легочный сурфактант, макрофаги, *M. bovis* BCG, сканирующая электронная микроскопия, конфокальная лазерная микроскопия

DOI: 10.5959/MSU0137-0952-16-80-3-5

Введение

Туберкулез легких (ТЛ) — социально значимое инфекционное заболевание, которое ежегодно уносит жизни более миллиона человек [1]. Туберкулезное воспаление сопровождается снижением выработки альвеолоцитами II легочного сурфактанта (ЛС) — компонента сурфактантно-альвеолярного мембранного комплекса, необходимого не

только для дыхания, но и для реализации защитных реакций в легких. Снижение выработки сурфактанта сопровождается накоплением в бронхоальвеолярном лаваже макрофагов с нарушенной фагоцитарной функцией. В свою очередь, введение экзогенного ЛС (ЭЛС) в материал бронхоальвеолярного лаважа, полученного от больных активным ТЛ, вызывает снижение доли нефагоцитирующих

макрофагов почти в 2 раза [2]. Предполагается, что благодаря специфическим белкам SP-A и SP-D, сурфактант выступает в качестве опсонизирующего фактора, который узнается паттерн-распознающими рецепторами макрофагов. Одновременно с ними с мишенью взаимодействуют «scavenger»-рецепторы [3]. Таким образом, ЛС является необходимым компонентом легких для реализации фагоцитарной функции макрофагов.

В макрофагах, а также в эпителии бронхов и респираторного отдела, присутствуют белки-экспортеры, получившие название «белки множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ). Они экспортируют различные субстраты из клеток, в том числе лекарственные препараты, снижая эффективность химиотерапии при различных заболеваниях. Среди белков МЛУ особое внимание заслуживает Р-гликопротеин (P-glycoprotein, P-gp).

Р-gp — трансмембранный белок-экспортер, относящийся к суперсемейству АТФ-связывающих транспортеров (ATP Binding Cassette). Р-gp кодируется геном *ABCB1* (*MDR1*), в норме на высоком уровне экспрессируется в бронхоальвеолярном эпителии, альвеолярных и рециркулирующих макрофагах [4]. При активном туберкулезном воспалении уровень его экспрессии возрастает [5]. На сегодняшний день известно, что Р-gp обладает наиболее широкой субстратной «всеядностью» из известных белков МЛУ и может экспортировать вещества самой разной химической структуры. Список субстратов для Р-gp постоянно пополняется, и по данным сайта Drugbank включает в себя сотни различных лекарственных агентов, в том числе — противотуберкулезные препараты [6]. Инфицированные *Mycobacterium tuberculosis* макрофаги также характеризуются экспрессией гена *ABCB1* и присутствием функционально активного Р-gp [7].

Функциональная активность Р-gp определяется его структурными особенностями и свойствами плазматической мембраны клеток, на которой он локализуется [8]. Массовое встраивание Р-gp в плазматическую мембрану изменяет ее характеристики и, в частности, взаимодействие с актиновым цитоскелетом [9]: именно актиновые филаменты задействуются клетками при активации клеточной поверхности на ранних стадиях эндоцитоза/фагоцитоза [10]. Таким образом, имеются данные, указывающие на возможное участие Р-gp в процессе фагоцитоза.

Реализация фагоцитоза является фундаментальным свойством макрофагов. Макрофаги, как фагоциты, играют наибольшую роль в поддержании гомеостаза тканей в норме и при воспалении, регенерации и восстановлении, а также в иммунном ответе на патогенные микроорганизмы. Именно эти клетки одни из первых контактируют с возбудителем ТЛ, и их функциональная активность определяет эффективность борьбы с *Mycobacterium tuberculosis*. В связи с этим является чрез-

вычайно актуальным совершенствование наших знаний о факторах, определяющих эффективность фагоцитоза. Представляется важным ответить на вопрос о роли Р-gp в макрофагах при воздействии активатора фагоцитоза — препарата ЭЛС, который используется в клинической практике. Целью настоящей работы стало выявление взаимосвязи между активацией клеточной поверхности и присутствием Р-gp в миелоидных клетках человека при действии ЭЛС. В работе использовали две экспериментальные модели на основе культивируемых клеток человека:

(1) провоспалительные макрофаги человека ТНР-1, инфицированные *M. bovis* BCG. Нами ранее было продемонстрировано, что высокие уровни фагоцитоза, экспрессии гена *ABCB1* и функциональной активности Р-gp реализуются в макрофагах ТНР-1 к 3-м сут дифференцировки [11–13]. Модель макрофагов ТНР-1 при действии сурфактанта может рассматриваться как модель альвеолярно-подобных макрофагов [14].

(2) родительские клетки миелобластной лейкемии K562 (Р-gp⁺) и клетки K562/i-S9 с трансфицированным геном *ABCB1* и высокой активностью Р-gp [15], индуцированные к адгезии. В данной модели клетки различаются по выраженной экспрессии только одного гена *ABCB1*, что позволяет ответить на вопрос о влиянии присутствия Р-gp на ранние стадии фагоцитоза.

В качестве активатора клеточной поверхности для обеих моделей использовали препарат бычьего ЭЛС.

Материалы и методы

Линии культивируемых клеток. Клеточная линия ТНР-1 — острая моноцитарная лейкемия (Российская коллекция клеточных культур, г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина при 37°C и 5% CO₂ в культуральных флаконах (25 см³, SPL Life Sciences, Республика Корея). Суспензионную культуру пассировали каждые 3–5 сут.

Клеточная линия K562 — хроническая миелогенная лейкемия, клетки выделены из плевральной жидкости (Российская коллекция клеточных культур, г. Санкт-Петербург, Россия), и ее субклон K562/i-S9 с активным Р-gp получен путем стабильной трансфекции гена *MDR1* (*ABCB1*) проф. Мечетнером Е.Б., Калифорнийский Университет в Ирвайне (University of California at Irvine) [15]. Обе линии любезно предоставлены Рыбалкиной Е.Ю. (ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Для индукции макрофагальной дифференцировки клеток ТНР-1 и адгезии клеток K562 и K562/i-S9 использовали форболовый эфир

(РМА, 12-O-tetradecanoyl-13-phorbolmyristate; Sigma, США). Стоковая концентрация РМА составила 2×10^{-2} М в ДМСО (ПанЭко, Россия). Клетки в концентрации 1×10^6 на 5 мл среды рассевали в культуральные флаконы и добавляли РМА в конечной концентрации 100 нМ на 2–4 ч однократно, затем меняли среду культивирования. В эксперименты с ЭЛС клетки K562 и K562/i-S9 брали через 24 ч после их адгезии, а ТНР-1 — через 72 ч после индукции дифференцировки.

Экзогенный легочный сурфактант. Экзогенный легочный сурфактант — препарат Сурфактант БЛ (ООО «Биосурф», Россия), полученный из легких крупного рогатого скота. Готовая лекарственная форма представляет собой 75 мг лиофилизата. По данным разработчиков препарата в составе ЭЛС содержится 62% фосфатидилхолина и до 2,5% специфических белков сурфактанта. Для экспериментов препарат разводили в 750 мкл среды RPMI-1640, экспериментальная концентрация составила 1 мг/мл.

Культивирование бактерий. *M. bovis* BCG, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP (*M. bovis* BCG-GFP, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза Туберкулеза), выращивали на среде Middlebrook 7H9 (BD Difco™, США) с добавлением 10% ростовой добавки Middlebrook OADC, глицерина 0,02% и 0,05% Tween 80 при 37°C.

Инфицирование макрофагов ТНР-1. ТНР-1 рассевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты с плотностью 500 тыс. клеток в 1 мл на лунку, добавляли РМА в конечной концентрации 100 нМ на 2–4 ч, после чего проводили смену среды культивирования. Через 72 ч макрофагальной дифференцировки добавляли *M. bovis* BCG отдельно или совместно с ЭЛС на 1 ч для последующего анализа методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) или *M. bovis* BCG-GFP отдельно или совместно с ЭЛС на 3 ч для последующего анализа методом КЛСМ. Бактерии находились в экспоненциальной фазе роста, их дважды промывали в PBS (phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) и ресуспендировали в RPMI-1640 без сыворотки. Инфицирование проводили в соотношении 10:1 бактерий на макрофаг. После инкубации клетки отмывали в бессывороточной культуральной среде (37°C, 5 мин), фиксировали 3,7%-ным параформальдегидом (MP Biochemical, Франция) на PBS (15 мин), отмывали в PBS (3 раза по 5 мин) и дополнительно окрашивали ядра DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; Sigma-Aldrich, США), DAPI добавляли в PBS до конечной концентрации 100 нМ на 10 мин. Препараты заключали в мовеол (Hoechst, Германия).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Фотосъемку клеток, инфицированных *M. bovis* BCG-GFP, проводили на микроскопе Leica

TCS SPE (Leica Microsystems, Германия) при длине волны лазера 488 нм. Ядра, окрашенные DAPI, анализировали при длине волны лазера 405 нм. Обработку изображений осуществляли с помощью программного пакета Leica LAS AF (Leica Microsystems, Германия). Анализ фагоцитарной активности клеток оценивали как процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего числа клеток по результатам трех экспериментов. В каждом эксперименте $n = 5000$ клеток. Для анализа данных использовали программное обеспечение Statistica 10, параметрический t-критерий Стьюдента. Этот критерий был выбран, так как данные имели нормальное распределение, что было проверено для каждой выборки по критерию Шапиро-Уилкса. Выборка в 5000 клеток была выбрана заранее согласно расчету 95%-ного доверительного интервала (биномиальная формула Уилсона).

СЭМ. Клетки фиксировали 2,5%-ным глутаральдегидом на PBS (pH 7,4) в течение 30 мин при 25°C и обезжизивали по следующей схеме: 50°, 70°, 80° и 96° спирт, ацетон (в каждой смене два раза по 10 мин). Образцы высушивали в критической точке (для CO₂ 31°C, 73,8 бар). Напыление производили смесью металлов Au-Pd и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380 LA (Jeol, Токуо, Япония) при напряжении 20 кВ. Исследования методом СЭМ были проведены с использованием оборудования центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ имени М.В. Ломоносова (уникальная научная установка «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»).

Результаты

Морфологическая характеристика клеточной поверхности инфицированных *M. bovis* BCG-макрофагов ТНР-1 без и в присутствии ЭЛС. Методом СЭМ изучена поверхность клеток ТНР-1 после инфицирования: на поверхности клеток преимущественно формируются округлые выросты размером до 0,2 мкм, складки, одиночные раффлы и филоподии размером до 1 мкм (рис. 1, А–В). Одиночные микобактерии палочковидной формы размером 1–2 мкм выявляются на поверхности клеток, где в области их контакта формируются выросты плазматической мембраны, захватывающие *M. bovis* BCG.

При культивировании клеток в присутствии *M. bovis* BCG и ЭЛС регистрируется значительная активация клеточной поверхности с формированием многочисленных филоподий, раффлов, округлых выростов, складок и фагоцитарных чаш (рис. 1, Д–Ж). Следует отметить, что при введении ЭЛС не только становится более выраженным формирование структур плазматической мембраны, характерных для инфицированных макрофа-

гов ТНР-1, но и появляются новые варианты: выросты округлой формы размером 0,5–1 мкм, филоподии размером 2–4 мкм и фагоцитарные чаши (таблица). В таких клетках достоверная идентификация *M. bovis* BCG среди клеточных выростов затруднена.

Фагоцитарный индекс инфицированных *M. bovis* макрофагов ТНР-1 без и в присутствии ЭЛС. Подсчеты фагоцитарного индекса показали, что в присутствии ЭЛС макрофаги ТНР-1 активно захватывают или поглощают *M. bovis* BCG-GFP, внутриклеточная локализация которых показана при помощи метода КЛСМ (рис. 1, Г–З). Фагоцитарный индекс через 3 ч инкубации в присутствии ЭЛС составляет $14,35 \pm 1,24$ против $8,28 \pm 0,9$ (даны средние значения $\pm$ стандартное отклонение по результатам 3 экспериментов) в контроле, т.е. возрастает в 1,7 раза ($p = 0,012$).

Таким образом, ЭЛС является эффективным активатором клеточной поверхности и поглощения *M. bovis* BCG-GFP в клетках ТНР-1, характеризующихся высокой функциональной активностью Р-гр. При этом важно отметить, что реакция клеточной поверхности макрофагов ТНР-1 в присутствии ЭЛС является более активной и выраженной, чем только в присутствии *M. bovis* BCG. Это демонстрирует, что ЭЛС является эффективным активатором фагоцитоза.

Активация клеточной поверхности K562 и K562/i-S9 при инкубации с ЭЛС. Родительские клетки K562 имеют округлую форму и гладкую поверхность, на которой идентифицируются отдельные раффлы (рис. 2, А, Б). Клетки K562/i-S9 также имеют преимущественно округлую форму, и на их поверхности формируются многочисленные складки (рис. 2, В, Г).

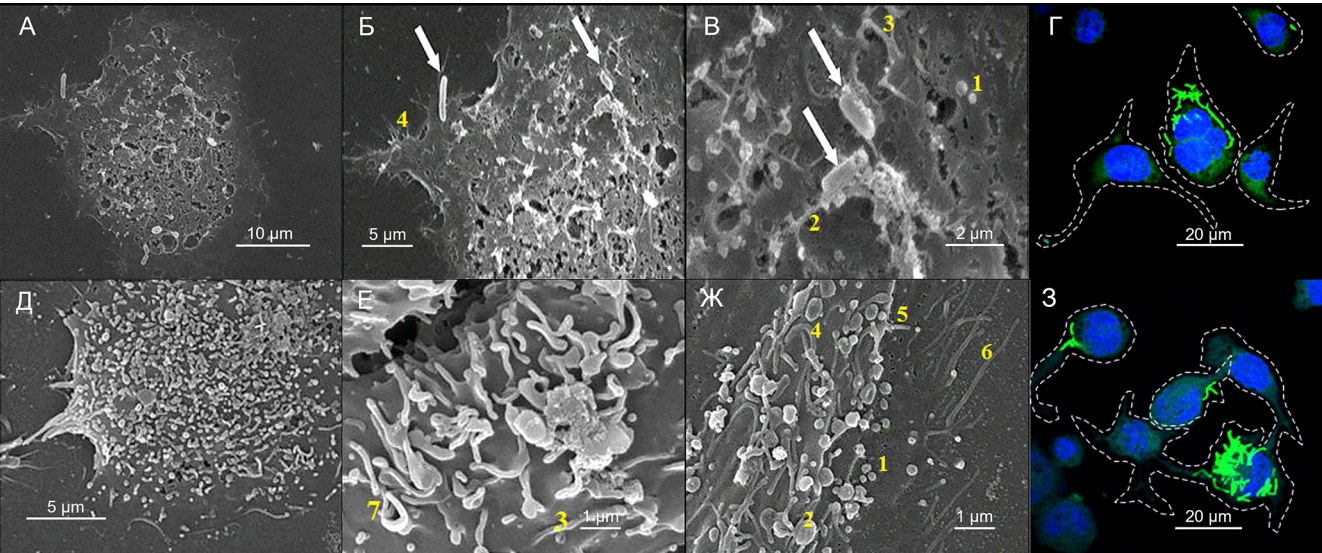


Рис. 1. Фагоцитарная активность инфицированных штаммом *M. bovis* BCG макрофагов ТНР-1 в присутствии ЭЛС. А–В – макрофаги ТНР-1, инфицированные штаммом *M. bovis* BCG. Стрелки указывают на *M. bovis* BCG на поверхности клеток. Д–Ж – макрофаги ТНР-1, инфицированные штаммом *M. bovis* BCG, в присутствии 1 мг/мл ЭЛС. 1 – выросты округлой формы размером до 0,2 мкм; 2 – выросты округлой формы размером 0,5–1 мкм; 3 – складки; 4 – раффлы; 5 – филоподии размером до 2 мкм; 6 – филоподии размером 2–4 мкм; 7 – фагоцитарная чаша. СЭМ. Г – ТНР-1, инфицированные *M. bovis* BCG-GFP. 3 – ТНР-1, инфицированные *M. bovis* BCG-GFP, 1 мг/мл ЭЛС. Зеленый цвет – *M. bovis* BCG-GFP, синий цвет – DAPI. Пунктирной линией показаны границы клеток, нанесенные на основе изображений микроскопии дифференциально-интерференционного контраста; КЛСМ

Таблица

Анализ структур поверхности клеток экспериментальных моделей при воздействии ЭЛС

	ЭЛС 1 мг/мл	Структуры плазматической мембраны						
		Складки	Раффлы	Филоподии 0,2–1 мкм	Филоподии 2–4 мкм	Округлые выросты 0,1–0,2 мкм	Округлые выросты 0,5–1 мкм	Фагоцитарные чаши
ТНР-1 + <i>M. bovis</i> BCG	–	+++	+	+	–	+	–	–
	+	+++	++++	+++	+++++	++++	+++++	+
K562	–	+		+	+	–	–	–
	+	++	+	+	++	+	++	–
K562/i-S9	–	++	–	–	+	–	–	–
	+	+	+++	+++++	++++	++++	++++	+

Примечание: количество «+» отражает выраженность плазматической мембраны на основе проведенных подсчетов с фото поверхности 30 клеток в каждом варианте

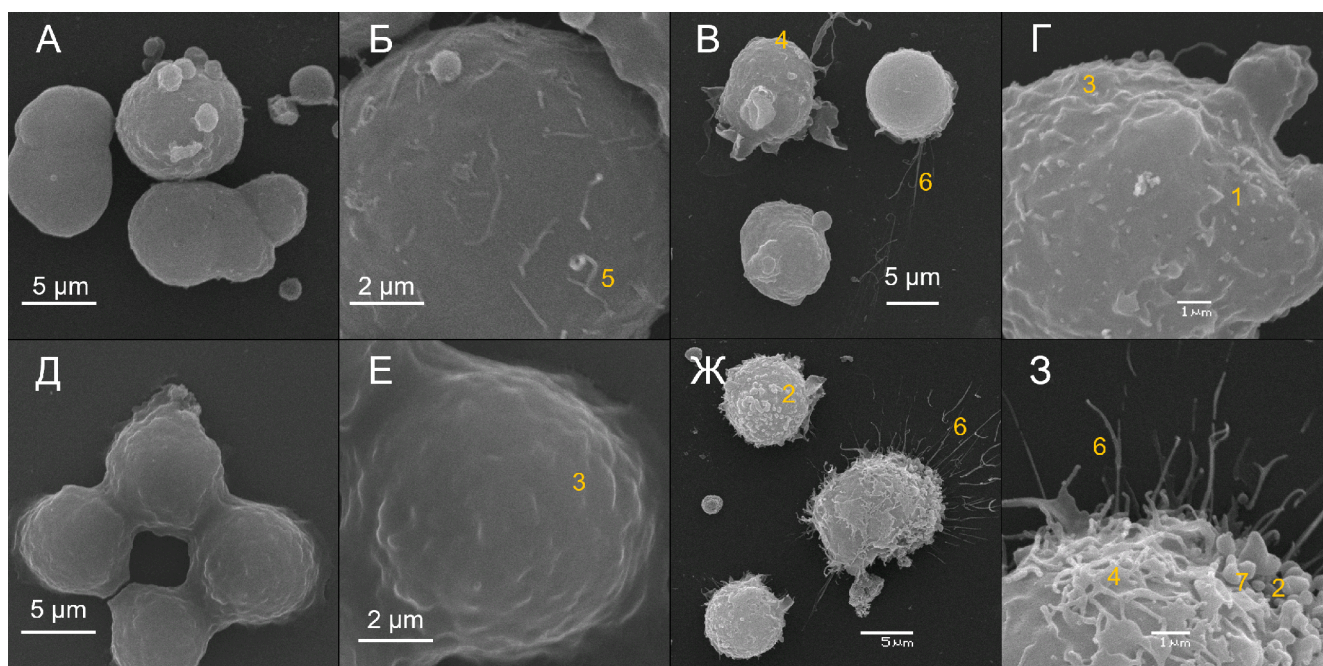


Рис. 2. Клеточная поверхность K562 и K562/i-S9, нативная и активированная ЭЛС. А, Б – контрольные клетки K562; В, Г – K562 в присутствии 1 мг/мл ЭЛС; Д, Е – контрольные клетки K562/i-S9; Ж, З – K562/i-S9 в присутствии 1 мг/мл ЭЛС. 1 – выросты округлой формы размером до 0,2 мкм; 2 – выросты округлой формы размером 0,5–1 мкм; 3 – складки; 4 – раффлы; 5 – филоподии размером до 2 мкм; 6 – филоподии размером 2–4 мкм; 7 – фагоцитарная чаша; СЭМ

Под действием ЭЛС на поверхности клеток K562 образуются отдельные филоподии длиной 1 мкм, раффлы и складки (рис. 2, Д, Е). Клетки линии K562/i-S9 в присутствии ЭЛС формируют на всей поверхности многочисленные филоподии, длина которых достигает 10 мкм, а также многочисленные складки и раффлы (рис. 2, Ж, З). Характеристика вариантов структур плазматической мембраны приведена в таблице.

Таким образом, наши данные напрямую демонстрируют зависимость активации клеточной поверхности миелоидных клеток K562 и K562/i-S9 от присутствия функционально-активного P-gr при действии ЭЛС.

Обсуждение

В данной работе продемонстрировано, что: (1) ЭЛС является эффективным активатором фагоцитоза при инфицировании макрофагов P-gr⁺ в модели *in vitro*; (2) выраженность эффекта ЭЛС как активатора фагоцитоза связана с присутствием P-gr, что доказано с использованием двух вариантов линии K562. Клетки K562/i-S9 отличаются от родительской линии K562 трансфекцией гена *ABCB1* и экспрессией P-gr и именно в них ЭЛС индуцирует массовое формирование различных выростов плазматической мембраны.

Выявленные морфологические изменения клеток в присутствии ЭЛС согласуются с данными, полученными для клеточной линии моноцитарной лейкемии мыши P388. Методом СЭМ продемонстрировано, что при действии адриамицина

для клеток P388/AdR (P-gr⁺) характерно образование длинных ворсинчатых выростов и складок, в то время как клетки P388/0 (P-gr⁻) формируют только короткие выросты [16].

Образование выростов плазматической мембраны сопровождается соответствующими изменениями цитоскелета, которые могут быть вызваны взаимодействием между P-gr и актином. В пользу этого предположения говорят данные, что фибробласты сирийского хомячка, отобранные по признаку высокой экспрессии P-gr с помощью селекции колхицином, характеризуются реорганизацией актинового цитоскелета и высокой метастатической активностью [17]. Наличие связи между P-gr, актиновыми филаментами и развитием лекарственной устойчивости клеток предполагается и в других работах [18]. Так, например, цитохалазин, нарушающий сборку микрофиламентов, усиливает внутриклеточное накопление лекарственных агентов в лейкозных клетках, экспрессирующих P-gr [19]. А нарушение структуры актинового цитоскелета увеличивает внутриклеточное накопление лекарственных средств и их цитотоксический эффект в клетках остеосаркомы, которые также экспрессируют P-gr [20].

Изучив ранее опубликованные работы, мы предположили, что взаимодействие P-gr и актинового цитоскелета опосредовано белками семейства ERM, в которое входят эзрин (Ezrin), радиксин (Radixin) и моэзин (Moesin). Эти белки действуют как связующие звенья между актиновым цитоскелетом и различными белками плазматической

мембраны, включая P-gp, MRP2 и HER2 [21]. ERM играют критическую роль в поддержании транспортной функции P-gp и его локализации на плазматической мембране, а также колокализуются с P-gp [22]. Принимая во внимание имеющиеся взаимодействия между P-gp, белками ERM и активными филаментами, можно предположить, что клетки P-gp⁺ более склонны к активации клеточной поверхности и фагоцитозу, чем клетки P-gp⁻. При этом важно изучить роль P-gp не только при активации фагоцитоза, но и других вариантов эндоцитоза [23]. Это может быть актуально для повышения эффективности доставки лекарств в очаг туберкулезного воспаления.

Заключение

Нам представляется перспективным направлением разработка и применение противотуберкулезных препаратов – активаторов фагоцитоза. Для макрофагов реализация фагоцитарной активности является их фундаментальным свойством, позволяющим им бороться с возбудителем ТЛ. Анализ особенностей реализации фагоцитоза может в дальнейшем способствовать выявлению перспективных мишеней для разработки новых терапевтических и фармакологических подходов, повышающих эффективность противотуберкулезной терапии – в частности, в рамках развития тера-

пии, направленной на пациента (host directed therapy). Как показывают наши данные, P-gp влияет на активность фагоцитарного процесса: выявлена взаимосвязь между присутствием функционально активного P-gp на плазматической мембране и активацией поверхности миелоидных клеток под действием ЭЛС. Требуется дальнейшее уточнение роли P-gp в данном процессе, в том числе с применением разных вариантов ингибирования P-gp. Это является важным не только для лучшего понимания данного феномена, но и для разработки новых подходов лечения ТЛ в рамках персонализированной медицины.

Выражаем благодарность заведующему отделом иммунологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза д.м.н., профессору В.В. Еремееву за предоставленные микобактерии *M. bovis* BCG-GFP. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного заказа Правительства Российской Федерации Центральному научно-исследовательскому институту туберкулеза и Московскому государственному университету имени М.В. Ломоносова. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Lepekha L.N., Alexandrova E.A., Erokhina M.V. *In vitro* effects of pulmonary surfactant on macrophage morphology and function. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012;152(4):489–493.
3. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*. 2016;44(3):463–475.
4. Mairinger S., Hernández-Lozano I., Filip T., Löbsch M., Stanek J., Zeitlinger M., Hacker M., Tournier N., Wanek T., Ehrhardt C., Langer O. Influence of P-glycoprotein on pulmonary disposition of the model substrate [11C] metoclopramide assessed by PET imaging in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2023;183:106404.
5. Pavlova E.N., Lepekha L.N., Rybalkina E.Yu., Tarasov R.V., Sychevskaya K.A., Voronezhskaya E.E., Masyutin A.G., Ergeshov A.E., Erokhina M.V. High and low levels of ABCB1 expression are associated with two distinct gene signatures in lung tissue of pulmonary TB patients with high inflammation activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(19):14839.
6. Wishart D.S., Knox C., Guo A.C., Shrivastava S., Hassanali M., Stothard P., Chang Z., Woolsey J. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D668–D672.
7. Wu Q., Hossfeld A., Gerberick A., Saljoughian N., Tiwari C., Mehra S, et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis enhancement of macrophage P-glycoprotein expression and activity on intracellular survival during antituberculosis drug treatment. *J. Infect. Dis.* 2019;220(12):1989–1998.
8. Juvala I.I.A., Hamid A.A.A., Halim K.B.A., Has A.T.C. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*. 2022;8(6):e09777.
9. Kobori T., Tameishi M., Tanaka C., Urashima Y., Obata T. Subcellular distribution of ezrin/radixin/moesin and their roles in the cell surface localization and transport function of P-glycoprotein in human colon adenocarcinoma LS180 cells. *PLoS One*. 2021;16(5):e0250889.
10. Mylvaganam S., Freeman S.A., Grinstein S. The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Curr. Biol.* 2021;31(10):R619–R632.
11. Kurnina A.V., Erokhina M.V., Makarevich O.A., Sysoeva V.Yu., Lepekha L.N., Kuznetsov S.A., Onishchenko G.E. Plasticity of human THP–1 cell phagocytic activity during macrophagic differentiation. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018;83(3):200–214.
12. Erokhina M.V., Pavlova E.N., Tarasova E.K., Kurnina A.V., Potashnikova D.M., Lepekha L.N., Ergeshov A.E., Onishchenko G.E. Nanoparticles of lactic acid polymer with rifampicin decrease the P-gp multidrug transporter activity in human macrophages. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(3):152–158.
13. Pavlova E.N., Erokhina M.V., Rybalkina E.Yu., Potashnikova D.M., Masyutin A.G., Lepekha L.N., Ergeshov A.E. The effect of rifampicin on the induction of MDR1/P-GP activity in proinflammatory human macrophages. *Antibiot Khimioter.* 2022;67(3–4):16–22.

14. Sadofsky L.R., Hayman Y.A., Vance J., Cervantes J.L., Fraser S.D., Wilkinson H.N., Williamson J.D., Hart S.P., Morice A.H. Characterisation of a new human alveolar macrophage-like cell line (DAiSy). *Lung*. 2019;197(6):687–698.
15. Mechetner E.B., Schott B., Morse B.S., Stein W.D., Druley T., Davis K.A., Tsuruo T., Roninson I.B. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(24):12908–12913.
16. Radel S., Fredericks W., Mayhew E., Baker R. P-glycoprotein expression and modulation of cell-membrane morphology in adriamycin-resistant P388 leukemia cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990;25(4):241–246.
17. Erokhina M.V., Shtil A.A., Shushanov S.S., Sidorova T.A., Stavrovskaya A.A. Partial restoration of the actin cytoskeleton in transformed Syrian hamster fibroblasts selected for low levels of 'typical' multidrug resistance. *FEBS Lett.* 1994;341(2–3):295–298.
18. Su L., Fu L., Li Y., Yang F., Zhang M., Hu D. Disruption of the association between drug transporter and actin cytoskeleton abolishes drug resistance in hypertrophic scar. *Oncotarget*. 2016;8(2):2617–2627.
19. Tsuruo T., Iida H. Effects of cytochalasins and colchicine on the accumulation and retention of daunomycin and vincristine in drug resistant tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 1986;35(7):1087–1090.
20. Takeshita H., Kusuzaki K., Ashihara T., Gebhardt M.C., Mankin H.J., Hirasawa Y. Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance. *Cancer Lett.* 1998;126(1):75–81.
21. Ogihara T., Mizoi K., Kamioka H., Yano K. Physiological roles of ERM proteins and transcriptional regulators in supporting membrane expression of efflux transporters as factors of drug resistance in cancer. *Cancers*. 2020;12(11):3352.
22. Yano K., Okabe C., Fujii K., Kato Y., Ogihara T. Regulation of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.* 2020;72(4):575–582.
23. Hirota K., Terada H. *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech; 2012. 414 pp.

Поступила в редакцию 05.02.2025

После доработки 06.06.2025

Принята в печать 09.10.2025

RESEARCH ARTICLE

The activity of the transporter protein P-gp in human macrophages enhances the effect of pulmonary surfactant

E.K. Tarasova¹ , L.N. Lepekha¹ , A.G. Masyutin^{1, 2} ,
E.A. Scherbakova¹ , M.V. Erokhina^{1, 2, *} 

¹Department of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, Central Tuberculosis Research Institute, 2 Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564, Russia

²Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

*e-mail: masha.erokhina@gmail.com

Pulmonary surfactant is an essential component of the respiratory system for the implementation of phagocytosis by alveolar macrophages. Pulmonary tuberculosis is associated with the reduced pulmonary surfactant production and the phagocytic function of macrophages. The transporter protein P-gp (*ABCB1* gene) is overexpressed in lung cells and exports numerous substrates. The incorporation of P-gp into the plasma membrane alters its characteristics. The aim of this study was to analyze the relationship between P-gp and the phagocytic activity of macrophages under the influence of exogenous pulmonary surfactant. The study employed scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy methods, as well as two models of cultured human cells: (1) pro-inflammatory THP-1 macrophages (P-gp+), infected with *M. bovis* BCG (this model, when exposed to surfactant, is considered a model of alveolar-like macrophages); and (2) parental myeloblastic leukemia K562 cells (P-gp-) and K562/i-S9 cells (P-gp+) transfected with the *ABCB1* gene and induced to adhere. In model 1, it was found that the addition of 1 mg/ml of exogenous pulmonary surfactant for 1 h led to the formation of numerous long filopodia, ruffles, and phagocytic cups, as well as a 1.7-fold increase in the phagocytic index. This demonstrates that the surfactant is an effective activator of phagocytosis in infected macrophages. In model 2, it was shown that in the presence of P-gp, the surface activity of cells significantly increased under the influence of exogenous pulmonary surfactant compared to cells without P-gp. It is hypothesized that due to the interaction between P-gp, ERM complex proteins (ezrin, radixin, moesin) and actin filaments, P-gp+ cells are more potentiated for cell surface activation and phagocytosis than P-gp- cells. Further analysis of the features of infected macrophages' phagocytosis depending on P-gp activity may contribute to the development of new drugs aimed at regulating the phagocytic activity of macrophages.

Keywords: *tuberculosis, P-glycoprotein, pulmonary surfactant, macrophages, M. bovis BCG, scanning electron microscopy, confocal laser microscopy*

Funding: The research was carried out as part of the scientific project of the state order of the Government of Russian Federation to Central Tuberculosis Research Institute and Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторах

Тарасова Екатерина Константиновна — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: shalioto6@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0438-7233>

Лепеха Лариса Николаевна — проф., докт. биол. наук, гл. науч. сотр. отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: lep3@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6894-2411>

Масютин Александр Георгиевич — ст. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ; ст. науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: squiggoth@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8067-4261>

Шербакова Екатерина Андреевна — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: scherbakova_katya@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5651-1454>

Ерохина Мария Владиславовна — докт. биол. наук, доц. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ; зав. лабораторией клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: masha.erokhina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7256-4679>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.344

Оценка гетерогенности комплексов фотосистемы II клеток водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях азотного голодания с использованием математической модели

Р.Н. Червицов*, С.С. Хрущев, П.В. Фурсова, Т.Ю. Плюснина

Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24

*e-mail: roman123qwe123@gmail.com

Изучение реакций клеток микроводорослей на такие стрессовые воздействия, как недостаток элементов минерального питания, является важной экологической задачей. Изменения, происходящие в фотосинтетическом аппарате, отражаются на кинетике экспериментально измеренных кривых индукции флуоресценции хлорофилла. Для анализа изменения формы кривых разрабатываются различные математические методы, позволяющие провести экспресс-анализ большого количества кривых. В работе продемонстрировано применение простой математической модели фотосистемы II (ФСII) для оценки изменения параметров ФСII культуры клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*, растущей при дефиците соединений азота в среде. Модель описывает переходы между тремя ключевыми состояниями ФСII, различающимися по степени окисления ее компонентов. С помощью этой математической модели было выявлено увеличение доли реакционных центров, содержащих антенны с меньшим размером, а также возрастание доли неактивных кислород-выделяющих комплексов.

Ключевые слова: математическая модель, гетерогенность фотосистемы II, фотосинтез, флуоресценция хлорофилла, азотное голодание, антенный комплекс, кислород-выделяющий комплекс

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-6

Введение

Оценка состояния водных экосистем, обеспечивающих жизнедеятельность фотосинтезирующих организмов, представляет собой важную экологическую задачу. Действие различных факторов стресса вызывает нарушение процессов, связанных с фотосинтезом, что в итоге может приводить к нарушению баланса водных экосистем и массовой гибели водорослей. К факторам, приводящим к нарушению процессов фотосинтеза и повреждению клеток, относится присутствие в среде обитания токсикантов, недостаточное или избыточное освещение, дефицит элементов минерального питания, таких как азот, фосфор или сера. В связи с этим актуальным является исследование изменения состояния фотосинтетического аппарата клеток водорослей при воздействии упомянутых факторов. Для исследования механизмов воздействия факторов стресса на фитопланктон удобно использовать лабораторную культуру водорослей *Chlorella vulgaris* [1, 2].

Одним из важнейших элементов минерального питания является азот. Азот входит в состав

всех аминокислот, из которых состоят белки, а также присутствует в молекулах хлорофилла. Дефицит азота приводит к снижению содержания хлорофилла и важнейших для растительных клеток белков тилакоидной мембраны, входящих в комплексы электрон-транспортной цепи хлоропластов — фотосистем I и II, цитохромного b_6f -комплекса и АТФ-синтазы, а также основного фермента, участвующего в фиксации CO_2 в темновой фазе фотосинтеза — рибулозодифосфаткарбоксилазы (рубиско) [3]. В итоге это приводит к снижению эффективности процессов световой фазы, к генерации активных форм кислорода за счет избыточной световой энергии и подавлению цикла Кальвина [4].

Фотосистема II (ФСII), схематическое изображение которой приведено на рис. 1А, является трансмембранным белковым комплексом, входящим в состав электрон-транспортной цепи хлоропласта. При поглощении кванта света димером хлорофилла P_{680} происходит разделение зарядов: электрон от P_{680} переходит последовательно на феофитин (Phe), первичный хинон Q_A и подвиж-

ный вторичный хинон Q_B ; окисленный димер хлорофилла P_{680}^+ восстанавливается за счет электронов, полученных при окислении воды марганцевым кластером $(Mn)_4$, входящим в состав кислород-выделяющего комплекса (КВК), и переходящих от $(Mn)_4$ на P_{680} через промежуточный акцептор тирозин- Z (Tyr_Z).

Реакционные центры ФСII гетерогенны по своей природе. Гетерогенность может проявляться в строении и размере светособирающей антенны [5], активности КВК [6] или в способности передавать электрон от ФСII к последующим переносчикам электрон-транспортной цепи [7]. По изменению характеристик, связанных с гетерогенностью реакционных центров, можно судить о воздействии факторов стресса.

В популяции реакционных центров ФСII выделяют альфа-центры с наибольшим размером антенны (в которых присутствуют и внутренняя, и периферическая антенны), а также бета-центры, у которых периферическая антенна отсутствует. Известно, что альфа- и бета-центры распределены в мембранах хлоропласта неравномерно: основной пул альфа-центров расположен в гранальных тилакоидах, а бета-центры — в основном в мембранах стромальной области [8]. Впервые гетерогенность реакционных центров обнаружена с помощью кривых индукции флуоресценции хлорофилла, измеренных в присутствии диуона (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, DCMU) [9]. DCMU — ингибитор переноса электронов с Q_A на Q_B ; поэтому такие кривые отражают только этап накопления восстановленного Q_A . В кинетике нарастания этих кривых визуально наблюдается только одна фаза (рис. 1Б), однако применение специальных методов анализа позволяет выявить несколько фаз, различающихся по

характерному времени восстановления Q_A , что объясняется наличием нескольких типов реакционных центров с различным размером антенного комплекса [9–12]. Наличие нескольких фаз можно выявить методом мультиэкспоненциальной аппроксимации либо с помощью математической модели [11]. Быстрая фаза кривой характеризует максимальный размер антенного комплекса (альфа-центры), который содержат наибольшее число белков антенны (периферической и внутренней). Медленная фаза кривой характеризует центры, в которых отсутствует часть периферического светособирающего комплекса (бета-центры).

Существует большое количество математических моделей, описывающих процессы, происходящие в ФСII, как детальных [13–15], так и упрощенных [11, 16, 17]. Модели ФСII обычно описывают кинетику индукции флуоресценции хлорофилла [11, 13–16] или затухания флуоресценции хлорофилла [17–19]. Такие модели используются для выявления связи между процессами, происходящими в фотосинтетическом аппарате, и формой кривой. Детальные математические модели, описывающие процессы в ФСII, хорошо подходят для решения прямых задач (изучение изменений формы кривой при изменении параметров), однако решение обратных задач — определение значений параметров модели по экспериментальным данным — как правило, неоднозначно, так как сходные изменения формы кривой могут быть связаны с изменением различных параметров. Упрощенные модели, содержащие небольшое число уравнений и параметров, напротив, часто позволяют решать обратные задачи, однако найденные параметры можно интерпретировать только в рамках тех упрощений, на основе которых строилась модель.

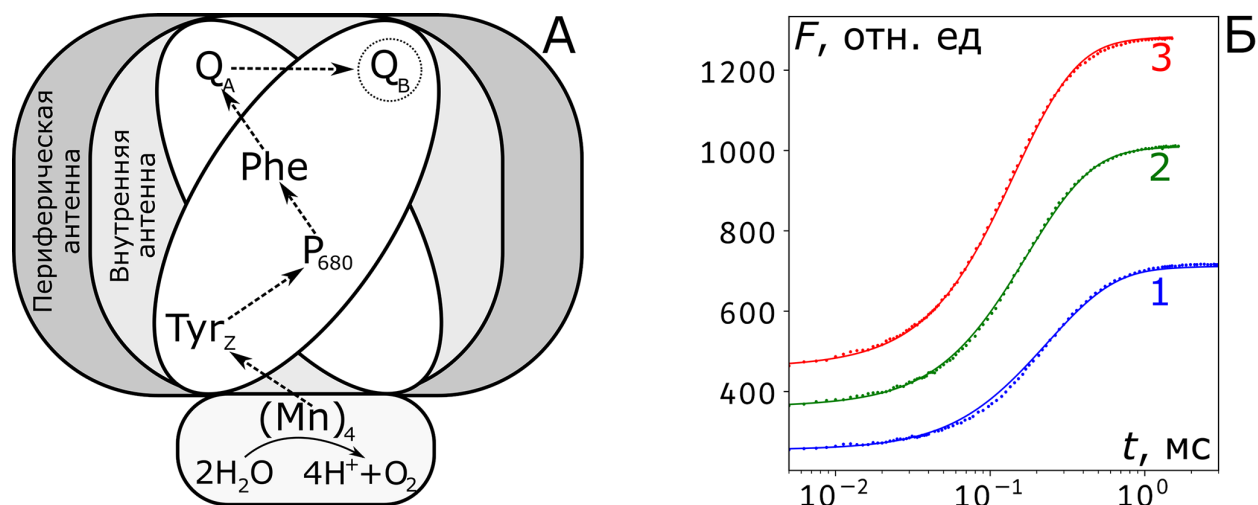


Рис. 1. (А) Схематическое изображение комплекса фотосистемы II. Элементы ФСII: $(Mn)_4$ — кислород-выделяющий комплекс (марганцевый кластер); Tyr_Z — тирозин- Z ; P_{680} — димер хлорофилла a ; Phe — феофитин; Q_A — первичный хинон, Q_B — вторичный хинон. Сплошной стрелкой показана реакция окисления воды, пунктирными стрелками — транспорт электрона. **(Б)** Типичные кривые индукции флуоресценции хлорофилла, измеренные в присутствии DCMU при действующем свете интенсивностью 3440 (кривая 1), 4900 (кривая 2), 6230 (кривая 3) $мкЭ \cdot м^{-2} \cdot с^{-1}$. Точки — экспериментальные данные, измеренные на 29-м ч роста культуры. Непрерывные кривые — результат аппроксимации экспериментальных данных с помощью модели.

Ранее [11] нами была разработана редуцированная математическая модель ФСЦ при действии DCMU, полученная из детальной модели путем ее пошаговой редукции. Простая форма полученных уравнений позволяет составлять комбинации из таких моделей для описания различных типов реакционных центров ФСЦ, что дает возможность выявлять их гетерогенность по размеру и строению антенного комплекса (альфа- и бета-центры), а также по активности КВК, которая не учитывалась в более ранних моделях [14, 17]. Основным ограничением модели является возможность учесть состояния элементов ФСЦ только до первичного хинона Q_A , поскольку для выявления гетерогенности реакционных центров ФСЦ необходимо исключить влияние процессов переноса электронов на последующие акцепторы электрон-транспортной цепи хлоропласта. Тем не менее редуцированная модель показала свою эффективность для описания гетерогенности ФСЦ у разных видов водорослей, которые культивировались при разной освещенности и температуре, избытке и недостатке элементов минерального питания в среде [11, 12]. В данной работе разработанная нами редуцированная модель ФСЦ [11] используется для оценки изменения соотношения долей реакционных центров ФСЦ с различным размером антенны и различной активностью КВК в ответ на стресс, вызванный дефицитом азота в среде при культивировании водорослей *Chlorella vulgaris*.

Материалы и методы

1. Получение экспериментальных данных

1.1. Культивирование микроводорослей. Эксперименты проводились на периодической культуре быстрорастущего термофильного штамма *Chlorella vulgaris*. Микроводоросли культивировали в панельном фотобиореакторе объемом 1 л на среде Тамия в разведении 1:30 при температуре $36,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$, непрерывном освещении белым светом $180 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и продувке воздушной смесью с высоким содержанием CO_2 (0,4%) со скоростью потока 1 л в минуту. Перемешивание осуществлялось за счёт барботирования воздушной смесью. Подробное описание условий культивирования приведено в предыдущей работе [20]. Начальная оптическая плотность культуры при длине волны 675 нм составляла 0,01 в кювете толщиной 1 см. В ходе роста водорослей постепенно возникал дефицит азота в среде в связи с его поглощением растущей культурой.

1.2. Обработка проб DCMU и измерение индукционных кривых. Отборы проб для измерения кривых индукции флуоресценции проводились раз в 2 ч в период с 29-го ч по 47-й ч с момента начала культивирования. К 29-му ч роста культуры содержание NO_3^- снижалось с $52,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ до $3,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, к 31-му — до $1,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$, к 33-му — до $1,0 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$

и в дальнейшем оставалось практически постоянным на уровне $0,7 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ [20]. Оптическая плотность культуры при длине волны 675 нм составляла 0,49 на 29-м ч культивирования и возрастала до 0,68 на 40-м ч культивирования, после чего снижалась до 0,6 на 47-м ч [20]. Перед измерением пробы инкубировали в течение 15 мин с DCMU в концентрации $6\cdot 10^{-6} \text{ М}$ в темноте. Кривые индукции флуоресценции продолжительностью 1500 мс измеряли при помощи флуориметра МЕГА-25 (создан на кафедре биофизики Биологического факультета МГУ, Россия) [21] при трех интенсивностях действующего света — 3440, 4900 и $6230 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$. В качестве источника действующего света использовали светодиод с максимумом испускания на 455 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 670–750 нм с помощью кремниевого фотодиода.

2. Математическая модель

2.1. Схема и параметры модели ФСЦ. Для определения состояния и гетерогенности реакционных центров ФСЦ использовалась редуцированная математическая модель ФСЦ, описывающая кривую индукции флуоресценции хлорофилла при добавлении DCMU [11]. Схема редуцированной модели представлена на рис.2.

Система дифференциальных уравнений, описывающих схему на рис. 2, имеет вид:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = -k_x \cdot x \\ \frac{dy}{dt} = k_x \cdot x - k_y \cdot y \\ \frac{dz}{dt} = k_y \cdot y \end{cases}$$

где переменные x , y и z определяют долю реакционных центров; x — начальное состояние ФСЦ; y — состояние после поглощения фотона и разделения зарядов; z — состояние после восстановления P_{680} и окисления КВК; k_x и k_y — параметры, состоящие из сочетаний констант элементарных стадий детальной модели (для альфа- и бета-центров значения k_x различаются и в модели обозначаются $k_{x\alpha}$ и $k_{x\beta}$ соответственно) [11].

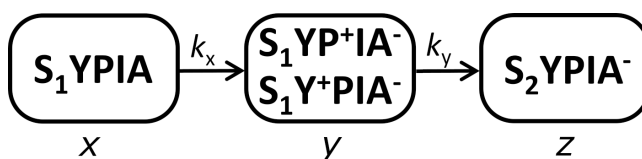


Рис. 2. Схема редуцированной модели. Элементы ФСЦ: S_1 и S_2 — состояния кислород-выделяющего комплекса; Y и Y^+ — состояния тирозина- Z , P и P^+ — состояния P_{680} (димера хлорофилла a); I — феофитин; A и A^- — состояния Q_A (первичного хинона). x , y , z — переменные модели, соответствующие ключевым состояниям ФСЦ.

Простой вид системы позволяет получить аналитическое решение:

$$\begin{cases} x = \exp(-k_x \cdot t) \\ y = \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_x \cdot t) - \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_y \cdot t) \\ z = \frac{k_y}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_x \cdot t) + \frac{k_x}{k_y - k_x} \cdot \exp(-k_y \cdot t) + 1 \end{cases}$$

Интенсивность флуоресценции описывается как сумма интенсивностей флуоресценции от трех ключевых состояний ФСII и, с учетом нормировки на её максимальное значение F_M , для реакционных центров с активным КВК рассчитывается по формуле:

$$F^{s+} = F_{ot} \cdot x + \frac{K_{Pred}}{K_{Pred} + 1} \cdot y + z,$$

где F_{ot} — отношение минимальной флуоресценции к максимальной (F_0/F_M), K_{Pred} — константа равновесия перехода электрона с тирозина-Z на P_{680} (состояние y является квазиравновесным). Поскольку появление состояния z связано с переносом электрона от КВК, то для реакционных центров с неактивным КВК оно не рассматривается, и флуоресценция с учетом нормировки на F_M от таких реакционных центров рассчитывается по формуле:

$$F^{s-} = F_{ot} \cdot x + \frac{K_{Pred}}{K_{Pred} + 1} \cdot y,$$

Модель позволяет описать 4 типа реакционных центров ФСII, различающихся по активности КВК (активных и неактивных) и по составу антенных комплексов (альфа-центры содержат периферическую и внутреннюю антенну, бета-центры содержат только внутреннюю антенну). Общая флуоресценция образца в модели представлена как комбинация флуоресценций 4 типов реакционных центров:

$$F = \alpha \cdot (s \cdot F_{\alpha}^{s+} + (1-s) \cdot F_{\alpha}^{s-}) + \beta \cdot (s \cdot F_{\beta}^{s+} + (1-s) \cdot F_{\beta}^{s-}),$$

где s — доля активных КВК, α — доля альфа-центров, β — доля бета-центров ($\beta = 1 - \alpha$).

2.2. Определение значений параметров и их стандартных отклонений. Значения параметров модели определялись путем аппроксимации экспериментальных данных модельными кривыми при помощи программы DBSolve Optimum 2020 [22], а затем чувствительность параметров модели (стандартные отклонения) определялась при помощи модуля lmfit языка программирования Python [23]; в обеих программах сумма квадратов отклонений модельных значений от экспериментальных (χ -квадрат) использовалась в качестве критерия качества аппроксимации.

Результаты

Кривые индукции флуоресценции были измерены при трех разных интенсивностях действующего света: 3440, 4900 и 6230 мкЭ·м⁻²·с⁻¹. Использование различных интенсивностей измерительного света позволило корректно идентифицировать параметры модели, поскольку серия таких кривых описывается одним набором параметров за исключением констант (k_{xa} , k_{xb}), которые меняются пропорционально интенсивности измерительного света. При идентификации параметров модели по сериям кривых, относящихся к разным стадиям роста культуры, предполагалось, что могут меняться доля альфа-центров (α) и эффективный размер светособирающей антенны альфа-центров (k_{xa}), доли активных КВК (s), а также отношение минимального F_0 и максимального F_M значений кривых, $F_{ot} = F_0/F_M$, характеризующее квантовый выход процессов диссипации энергии в реакционном центре ФСII. Эффективный размер светособирающей антенны бета-центров (k_{xb}) предполагался одинаковыми на всех стадиях роста, поскольку он характеризует светосбор реакционных центров ФСII без присоединенных дополнительных светособирающих комплексов. При анализе активности КВК мы исходили из предположения «всё или ничего», то есть предполагалось, что изменение активности КВК связано только с изменением доли реакционных центров ФСII с активным КВК (s), в то время как константа перехода КВК из S_1 в S_2 (k_y) и константа равновесия переноса электрона с тирозина-Z на P_{680} (K_{Pred}) в реакционных центрах с активным КВК не изменяются. Аппроксимация модели проводилась по всему набору экспериментальных данных, значение коэффициента детерминации составляло $R^2 = 0,999876$. На рис. 1Б показаны экспериментальные данные и модельные кривые для 29-го ч роста культуры.

В ходе определения стандартных отклонений параметров была обнаружена тесная взаимосвязь параметра K_{Pred} с параметрами s и k_y , которая выражается в том, что для любого значения параметра K_{Pred} из достаточно широкого диапазона можно подобрать соответствующие значения параметров s и k_y , при этом качество аппроксимации модели практически не изменится — и, соответственно, стандартные отклонения для этих трех параметров оказываются очень большими. Тем не менее, наилучшая аппроксимация достигается при значении $K_{Pred} = 1,08$, при этом оценка доли реакционных центров ФСII с активным КВК (s) лежит внутри диапазона допустимых значений от 0 до 1, ни на одном из этапов культивирования не достигая предельных значений. В связи с этим при определении стандартного отклонения параметра K_{Pred} был рассмотрен как постоянная величина. Значения параметров, полученные для экспериментальных кривых, измеренных на разных стадиях роста культуры, представлены в таблице.

Таблица

Параметры, полученные в результате аппроксимации экспериментальных кривых при помощи модели индукции флуоресценции, измеренных на разных часах роста культуры водорослей *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота

	29 ч	31 ч	33 ч	35 ч	37 ч	39 ч	41 ч	43 ч	45 ч	47 ч
F_{ot}	0,36**	0,36**	0,38**	0,38**	0,38**	0,38**	0,40**	0,42**	0,43**	0,45**
K_{Pred}	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*	1,08*
α	$0,81 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,01$
k_y	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$	$28,45 \pm 0,73$
k_{xa}	$4,49 \pm 0,06$	$4,53 \pm 0,06$	$4,69 \pm 0,06$	$5,00 \pm 0,06$	$5,28 \pm 0,06$	$5,16 \pm 0,06$	$5,57 \pm 0,07$	$5,88 \pm 0,08$	$6,14 \pm 0,08$	$6,30 \pm 0,09$
k_{xb}	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,06$
s	$0,84 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$

Примечания: Значения k_y , k_{xa} , k_{xb} приведены для интенсивности действующего света $3400 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$;

* – стандартное отклонение не определялось;

** – значение стандартного отклонения $\sigma < 0,01$.

Видно, что F_{ot} с момента исчерпания азота в среде (29-й ч роста культуры) увеличивается в течение 18 ч от 0,36 до 0,45 (на 25% по сравнению с начальным значением); соответственно квантовый выход первичных реакций фотосинтеза, выражающийся как $1 - F_{ot}$, падает на 14%. Таким образом, отсутствие азота в среде приводит к снижению эффективности работы ФСII. Доля альфа-центров (α), содержащих наибольшую по размеру антенну, включающую и периферическую, и внутреннюю части, спустя 18 ч после истощения азота в среде падает от 0,81 до 0,61 (на 25% от начального состояния), соответственно доля бета-центров (β), содержащих только внутреннюю антенну, увеличивается вдвое. Наибольшую чувствительность к отсутствию азота в среде показал КВК: доля активных КВК (s) за 18 ч уменьшилась от 0,84 до 0,13 (на 85% по сравнению с начальным значением), то есть за это время инактивировалась большая их часть.

Обсуждение

При анализе кривых индукции флуоресценции хлорофилла для культуры водорослей *Chlorella vulgaris* было выявлено снижение эффективности работы ФСII, выражающееся в возрастании F_{ot} (квантовый выход первичных фотохимических реакций, $F_v/F_M = 1 - F_{ot}$, при этом снижается). Снижение квантового выхода первичной фотохимии согласуется с полученными ранее оценками [20], которые были проведены с использованием JIP-теста. Вероятно, это связано с нарушением синтеза белков и хлорофилла при недостаточном количестве соединений азота. Одними из важных механизмов, защищающих фотосинтетический аппарат от различных повреждений и связанных с ними негативных эффектов, являются синтез и замена поврежденных белков, прежде всего, белка D1 – одной из кóровых субъединиц ФСII, которая наиболее подвержена светоиндуцированным повреждениям. Недостаток соединений азота в клетке существенно затрудняет использование этого за-

щитного механизма. Снижение доли альфа-центров, содержащих и периферическую, и внутреннюю антенну, может быть вызвано ингибированием синтеза белков периферического антенного комплекса и хлорофилла в связи с недостатком азота. Другая возможная причина – отсоединение периферического антенного комплекса от ФСII и его миграция к фотосистеме I (state transition): что приводит к перераспределению энергии между фотосистемами и защищает ФСII от избыточного поглощения энергии и повреждения фотосинтетического аппарата. При исчерпании азота в среде наблюдается увеличение световой константы альфа-центров – параметра, характеризующего эффективное сечение поглощения света. Это явление, по-видимому, обусловлено нарушением синтеза белков и пигментов, что затрудняет репарацию поврежденных реакционных центров. Поскольку альфа-центры организованы как димеры, при инактивации одного из центров энергия светособирающей антенны полностью направляется на оставшийся активный центр. В результате эффективное сечение поглощения на один активный реакционный центр возрастает.

Результаты, полученные с помощью редуцированной математической модели, в целом согласуются с оценками, проведенными нами ранее [20] для аналогичного эксперимента инкубирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* в условиях дефицита азота с помощью широко применяемого JIP-теста (метода, основанного на интерпретации значений флуоресценции в выбранных точках индукционной кривой и комбинации таких значений). Однако JIP-тест дает некие усредненные характеристики изменений для всех реакционных центров ФСII, тогда как математическая модель позволила выявить группы реакционных центров, различающихся по размеру светособирающей антенны и активности КВК, и описать изменение выявленной гетерогенности реакционных центров ФСII в процессе роста культуры в среде с дефицитом азота.

Заключение

Проведен анализ состояния и гетерогенности фотосинтетического аппарата клеток водорослей *Chlorella vulgaris*, выращенных в условиях дефицита соединений азота в среде, с помощью математической модели. В этих условиях снижалась эффективность работы ФСII, снижалось количество активных КВК, а также возрастало число реакционных центров без периферического антенного комплекса. Модель показала себя эффективным инструментом, обладающим высокой чувствительностью и информативностью при анализе изменений состояний ФСII в ответ на действие такого стресса, как азотное голодание. Предложенный

подход может применяться как в фундаментальных исследованиях, так и при решении практических задач управления ростом культуры микроводорослей в биотехнологии – в частности, с целью определения оптимальных режимов выращивания микроводорослей для получения определенных целевых продуктов.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Работу проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014;35:265–278.
2. Ru I.T.K., Sung Y.Y., Jusoh M., Wahid M.E.A., Nagappan T. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Appl. Phycol.* 2020;1(1):2–11.
3. Cetner M. D., Kalaji H. M., Goltsev V., Aleksandrov V., Kowalczyk K., Borucki W., Jajoo A. Effects of nitrogen-deficiency on efficiency of light-harvesting apparatus in radish. *Plant Physiol. Biochem.* 2017;119:81–92.
4. Chen, L.-H., Xu, M., Cheng, Z., Yang, L.-T. Effects of nitrogen deficiency on the photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, antioxidant system, and sulfur compounds in *Oryza sativa*. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(19):10409.
5. Karukstis K.K. Chlorophyll fluorescence analysis of photosystem II reaction center heterogeneity. *J. Photochem. Photobiol., B.* 1992;15(1–2):63–74.
6. Terentyev V.V., Shukshina A.K., Ashikhmin A.A., Tikhonov K.G., Shitov A.V. The main structural and functional characteristics of photosystem-II-enriched membranes isolated from wild type and *cia3* mutant *Chlamydomonas reinhardtii*. *Life.* 2020;10(5):63.
7. Antal T., Konyukhov I., Volgusheva A., Plyusnina T., Khrushev S., Kukarskikh G., Goryachev S., Rubin A. Chlorophyll fluorescence induction and relaxation system for the continuous monitoring of photosynthetic capacity in photobioreactors. *Physiol. Plant.* 2019;165(3):476–486.
8. Melis A. Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics.* 1991;1058(2):87–106.
9. Melis A, Homann P. Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* 1976;23(5):343–350.
10. Lazar D., Tomek P., Ilik P., Nauš J. Determination of the antenna heterogeneity of photosystem II by direct simultaneous fitting of several fluorescence rise curves measured with DCMU at different light intensities. *Photosyn. Res.* 2001;68(3):247–257.
11. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Degtereva N.S., Voronova E.N., Volgusheva A.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Three-state mathematical model for the assessment of DCMU-treated photosystem II heterogeneity. *Photosynth. Res.* 2024;159:303–320.
12. Дегтерева Н.С., Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Червицов Р.Н., Воронова Е.Н., Яковлева О.В., Антал Т.К., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Оценка гетерогенности антенны и активности кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II математическими методами. *Биофизика.* 2024;69(3):486–497.
13. Беляева Н.Е., Пашенко В.З., Ренгер Г., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Использование модели фотосистемы II для анализа индукционной кривой флуоресценции, вызванной насыщающим световым импульсом, во временном диапазоне 100 нс – 10 с. *Биофизика.* 2006;51(6):976–990.
14. Lazar D., Jablonsky J. On the approaches applied in formulation of a kinetic model of photosystem II: Different approaches lead to different simulations of the chlorophyll *a* fluorescence transients. *J. Theor. Biol.* 2009;257(2):260–269.
15. Беляева Н.Е., Булычев А.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Модель фотосистемы II для анализа нарастания индукционной кривой флуоресценции листьев высших растений. *Биофизика.* 2011;56(3):489–505.
16. Vredenberg W., Prášil O. Modeling of chlorophyll *a* fluorescence kinetics in plant cells: derivation of a descriptive algorithm. *Photosynthesis in silico. Advances in Photosynthesis and Respiration, vol 29.* Eds. A. Laisk, L. Nedbal, Govindjee. Dordrecht: Springer; 2009:125–149.
17. Vredenberg W., Prášil O. On the polyphasic quenching kinetics of chlorophyll *a* fluorescence in algae after light pulses of variable length. *Photosynth. Res.* 2013;117(1–3):321–337.
18. Schatz G.H., Brock H., Holzwarth A.R. Picosecond kinetics of fluorescence and absorbance changes in photosystem II particles excited at low photon density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(23):8414–8418.
19. Roelofs T.A., Lee C.-H., Holzwarth A.R. Global target analysis of picosecond chlorophyll fluorescence kinetics from pea chloroplasts. A new approach to the characterization of the primary processes in photosystem II α - and β -units. *Biophys. J.* 1992;61(5):1147–1163.
20. Plyusnina T.Yu., Khrushev S.S., Degtereva N.S., Konyukhov I.V., Solovchenko A.E., Kouzmanova M., Goltsev V.N., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Gradual changes in the photosynthetic apparatus triggered by nitrogen depletion

tion during microalgae cultivation in photobioreactor. *Photosynthetica*. 2020;58(SI):258–266.

21. Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В., Конюхов И.В., Рубин А.Б. Применение флуориметра «Мега-25» для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата. *Вода: химия и экология*. 2009;6(12):34–40.

22. Gizzatkulov N.M., Goryanin I.I., Metelkin E.A., Mogilevskaya E.A., Peskov K.V., Demin O.V. DBSolve Optimum: a software package for kinetic modeling which allows

dynamic visualization of simulation results. *BMC Syst. Biol.* 2010;4(1):109.

23. LMFIT: Non-linear least-squares minimization and curve fitting for Python. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://lmfit.github.io/lmfit-py/intro.html> (дата обращения: 15.04.2025)

Поступила в редакцию 22.04.2025

После доработки 21.08.2025

Принята в печать 14.10.2025

RESEARCH ARTICLE

Estimation of heterogeneity of photosystem II complexes of *Chlorella vulgaris* algae cells under nitrogen starvation using a mathematical model

R.N. Chervitsov* , S.S. Khruschev , P.V. Fursova , T.Yu. Plyusnina 

Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–24 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: roman123qwe123@gmail.com

The study of microalgae cell responses to stress factors such as mineral nutrient deficiency is an important ecological task. Changes in the photosynthetic apparatus are reflected in the kinetics of experimentally measured chlorophyll fluorescence induction curves. Various mathematical methods are developed to analyze changes in the shape of curves, allowing rapid analysis of a large number of curves. The paper demonstrates the use of a simple mathematical model of photosystem II (PSII) to assess changes in the PSII parameters of a *Chlorella vulgaris* microalgae cell culture growing under nitrogen deficiency in the medium. The model describes transitions between three key PSII states that differ in the oxidation state of its components. The mathematical model revealed an increase in the proportion of reaction centers containing smaller antennae, as well as an increase in the proportion of inactive oxygen-releasing complexes.

Keywords: *mathematical model, photosystem II heterogeneity, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, nitrogen starvation, antenna complex, oxygen-evolving complex.*

Funding: This study was performed under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторах

Червицов Роман Николаевич — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: roman123qwe123@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3310-6517>

Хрущев Сергей Сергеевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: styx@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4714-6221>

Фурсова Полина Викторовна — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: fursova@biophys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5426-6141>

Плюснина Татьяна Юрьевна — канд. физ.-мат. наук, доц. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-02-89; e-mail: plusn@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0734-1727>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.8+612.646+591.513

Сравнительный анализ динамики моторного и пространственного обучения у животных, переживших пренатальную гипоксию

А.В. Граф*, М.В. Маслова, А.С. Маклакова

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

*e-mail: grafav@my.msu.ru

Данные современной нейробиологии свидетельствуют о критической зависимости формирования нервной системы от условий внутриутробного развития. Гипоксия плода и/или новорожденного — одна из основных причин нарушений в развитии головного мозга, которые могут проявляться в более позднем возрасте в виде когнитивных расстройств, проблем с обучением, памятью и вниманием, движениями и эмоциями. В работе исследовали влияние пренатальной гипоксии, перенесенной в критические для развития и созревания мозга периоды, на способность белых крыс к моторному и пространственному обучению. Самцы, пережившие острую предродовую гипоксию, оказались наиболее чувствительными к ее воздействию, продемонстрировав в месячном возрасте как дефицит моторного обучения, воспроизведения и сохранения моторных навыков, так и ухудшение решения когнитивной задачи в Т-образном лабиринте. Острая гипоксия периода раннего органогенеза практически не оказала воздействия на способность животных перипубертатного возраста к моторному и пространственному обучению. Комплексное тестирование с использованием модифицированной методики обучения на вращающемся стержне позволяет более полно оценить последствия гипоксического повреждения мозга, что важно для ранней диагностики и разработки программ реабилитации.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, внутриутробное программирование, перипубертатный период, моторное обучение, пространственное обучение, нейропластичность

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-9

Введение

Современные экспериментальные и клинические исследования все чаще обращают внимание на феномен «пренатально обусловленных нарушений психического здоровья», объясняющий развитие нарушений и заболеваний нервной системы. В этой связи точное понимание нормального формирования мозга становится критически важным для изучения причин неврологических и когнитивных расстройств у взрослых, а также для анализа отклонений, выявляемых еще на этапе внутриутробного развития или у детей, родившихся раньше срока [1]. Течение беременности, родов и раннего постнатального периода имеет ключевое значение для нормального созревания и развития ребенка. Формирование нейронных цепей начинается на ранней стадии развития плода, демонстрируя пластичность на протяжении всей жизни человека. Интенсивность гистогенетических событий сильно варьирует в разные сроки беременности, во время которых развивающийся мозг характеризу-

ется повышенной чувствительностью к воздействию неблагоприятных эндогенных и внешних факторов [2]. К гипоксическим воздействиям развивающийся плод особенно уязвим в пренатальном периоде, когда происходит морфологическая дифференциация мозговых и нейронных структур, а также во время родов и перехода к самостоятельному дыханию [3]. Нарушения в виде снижения поступления кислорода (гипоксия), полной остановки газообмена в легких (асфиксия) или недостаточного кровоснабжения (ишемия) в эти критические периоды являются ведущими причинами перинатальной смертности и заболеваний в постнатальном периоде. Гипоксия плода и/или новорожденного является также одной из основных причин нарушений развития головного мозга, которые могут иметь долгосрочные последствия в виде когнитивных расстройств, проблем с обучением, памятью и вниманием, социальным взаимодействием, движениями и эмоциями [3, 4] и зависеть от пола и возраста [5]. Проблема как можно

более ранней диагностики даже минимальных когнитивных нарушений особенно актуальна ввиду роста числа случаев осложнений беременности, связанных с нарушением оксигенации плода, а также значительным увеличением числа поведенческих и ментальных расстройств.

Целью настоящего исследования была оценка влияния пренатальной гипоксии, перенесенной в критические периоды развития и созревания мозга, на способность животных к обучению с использованием аппаратно-программного комплекса «Ротарод» и Т-образного лабиринта.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Все исследования проведены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (European Science Foundation) и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным и одобрены Комиссией по биоэтике МГУ. Белых крыс стока Wistar обоего пола содержали при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности $53 \pm 5\%$ с циклом 12/12 часов свет / темнота (свет 9:00 = ZT 0, свет выключен 21:00 = ZT 12) и свободным доступом к еде и воде.

Беременных самок крыс подвергали острой гипоксии по стандартной методике [6] на 10-е ($n = 8$) либо 20-е ($n = 8$) сут беременности, которые соответствуют периодам раннего органогенеза и предродовому. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. Среднее время пребывания беременных самок в условиях острой гипоксии составило $141,6 \pm 30,0$ с на 10-е сут и $76,6 \pm 8,7$ с на 20-е сут беременности. Контрольных беременных самок ($n = 8$) гипоксии не подвергали.

В обучении участвовали три экспериментальные группы животных в возрасте 4–5 и 9–10 нед.: 1) контрольная – потомство самок, не подвергавшихся гипоксии во время беременности; 2) ПГ(10) – потомство, пережившее пренатальную гипоксию на 10-е сут гестации и 3) ПГ(20) – потомство, пережившее пренатальную гипоксию на 20-е сут гестации. Количество животных в экспериментальных группах указано в подписях к рисункам. В данной серии экспериментов на размер пометов и выживаемость потомства острая пренатальная гипоксия влияния не оказала. При рождении вес животных в группах ПГ(10) и ПГ(20) составлял $6,3 \pm 0,3$ г и $6,4 \pm 0,1$ г соответственно, и был значимо ниже веса контрольных животных, равного $7,2 \pm 0,1$ г.

Оценка моторного и пространственного обучения. Для моторного обучения использовали аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия). При помещении животного на вращающийся барабан установки обычно автоматически фиксируется время от начала движения до момента падения. Такой метод тестиро-

вания недостаточно чувствителен к слабым изменениям состояния организма, вызванным повреждением мозга, из-за чего некоторые функциональные нарушения могут остаться незамеченными. Чтобы, с одной стороны, точнее оценить влияние повреждений ЦНС на двигательные навыки и обучаемость, а с другой – сократить продолжительность эксперимента, в первые три дня тестирования применяли дополнительный протокол: если до завершения пятиминутного сеанса животное падало, его поднимали и снова помещали на вращающийся стержень. Кроме того, регистрировали не только латентный период до первого падения, но и другие параметры:

- продолжительность максимального пребывания животного на вращающемся стержне (время удержания, с);
- максимальное пройденное расстояние за один сеанс тестирования;
- общее количество падений, зафиксированных в течение пяти минут наблюдения;
- номер попытки с максимальным удержанием на вращающемся стержне.

Таким образом, модифицированная схема обучения животных с поэтапным увеличением сложности задания выглядела следующим образом:

- **1-е сут обучения** (28-е сут жизни) – фиксированная скорость вращения 10 об./мин, продолжительность 5 мин;
- **2-е сут обучения** (29-е сут жизни) – увеличение фиксированной скорости до 15 об./мин, продолжительность 5 мин;
- **3-и сут обучения** (30-е сут жизни) – адаптивный режим с плавным увеличением скорости от 5 до 20 об./мин за 1 мин и 4 мин с фиксированной скоростью 20 об./мин;
- **4-е (воспроизведение) и 11-е (сохранение навыка) сут** (31-е и 38-е сут жизни соответственно) – плавное увеличение скорости вращения с 5 до 30 об./мин в течение 5 мин; тестирование до падения животного, таким образом, в эти дни латентный период падения и максимальное время удержания на стержне совпадают.

Расширение спектра регистрируемых показателей повышает чувствительность теста к выявлению минимальных нарушений моторного обучения и помогает получить более полную картину изменений, происходящих в организме экспериментальных животных [7]. Кроме того, проводили проверку сохранности навыков моторного обучения у половозрелых животных (10-недельных) и сравнение их с показателями не обучавшихся ранее животных по схеме 4-х и 11-х сут тестирования. Животных, не проходивших предварительное поэтапное обучение в АПК «Ротарод», адаптировали к установке за 3 ч до тестирования в течение 4-х мин на скорости 15 об./мин.

Сочетание моторных и когнитивных тестов позволяет комплексно оценить последствия перина-

тального гипоксического повреждения мозга. Для оценки когнитивных функций — в частности, пространственного обучения — использовали Т-образный лабиринт с пищевым подкреплением (НПК Открытая Наука, Россия). Обучение 4–5-недельных животных проводили в течение 4-х последовательных суток, по 5 попыток с интервалом не менее 5 мин ежедневно. За сутки до начала обучения в течение 1 ч проводили адаптацию животных к обстановке, после чего вплоть до конца обучения содержали без еды со свободным доступом к воде. В ходе каждой попытки фиксировали: время принятия решения (время, затраченное на выбор правильного рукава лабиринта с приманкой), количество ошибок (выбор неверного рукава), время реакции — латентный период нахождения приманки. Также подсчитывали количество успешно выполненных попыток за каждый день обучения.

Статистическая обработка данных. Значения представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism, версия 10.4.1. (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, США). Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро-Уилка. Достоверность различий между несколькими экспериментальными группами оценивали с помощью многофакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом (post-hoc) Сидака. В тех случаях, когда распределение было нормальным, для сравнения экспериментальных групп с повторными измерениями в разные дни использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA (факторы «день» и «группа») с использованием дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным тестом (post-hoc) Сидака. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

1. Влияние острой пренатальной гипоксии на показатели моторного обучения крыс перипубертатного возраста. У контрольных животных отмечалась четкая положительная динамика в течение периода обучения: увеличивался латентный период до первого падения (рис. 1, А и Д), количество падений по мере повторения теста уменьшалось практически до минимума (рис. 1, Б и Е), что может отражать снижение тревожности и повышение уверенности животных и свидетельствует о формировании у них устойчивого двигательного навыка. Максимальное время удержания на вращающемся стержне оставалось стабильным на протяжении всего периода обучения (рис. 1, В и Ж), но достигалось в более ранних попытках (рис. 1, Г и З), то есть животные быстро адаптировались к увеличению скорости вращения, демонстрируя гибкость сенсомоторной интеграции и хорошую способность к обучению. Анализ не выявил статистически значимых различий

между самцами и самками по основным параметрам теста, следовательно, при отсутствии патологических факторов базовые моторные способности и обучаемость у крыс обоих полов в перипубертатный период сопоставимы.

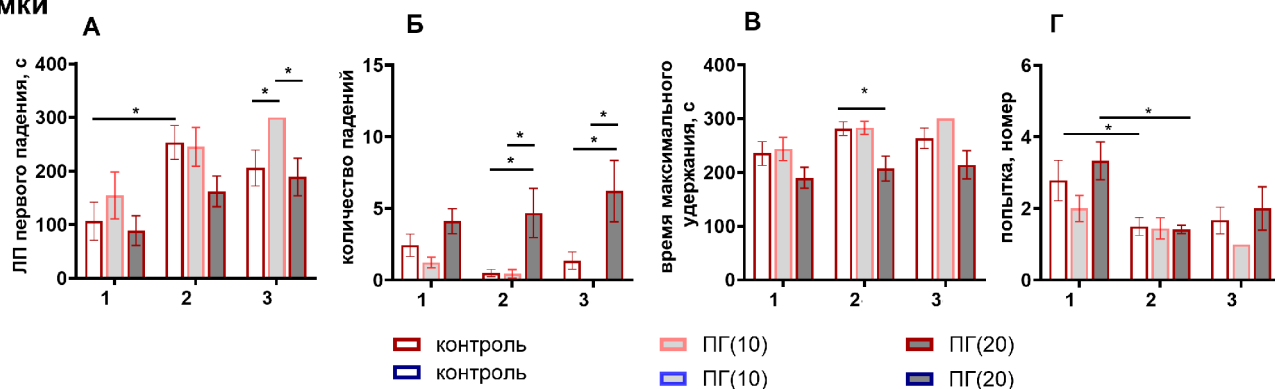
Проверка результатов обучения на 4-е и 11-е сут тестирования также не выявила межполовых различий (рис. 2). И самки, и самцы демонстрировали высокую способность к воспроизведению и сохранению моторных навыков: время удержания на стержне было близко к максимальному, зарегистрированному во время обучения, и составило у самок $222,8 \pm 28,5$ с на 4-е сут и $213 \pm 24,8$ с на 11-е сут; у самцов $254 \pm 14,6$ с и $241 \pm 14,7$ с соответственно. Таким образом, животные контрольной группы продемонстрировали поэтапную выработку двигательного навыка и высокую способность к его воспроизведению, сохранявшуюся и спустя неделю.

Животные обоих полов, подвергшиеся пренатальной гипоксии на раннем сроке гестации, демонстрировали схожую с контролем динамику обучения: снижение количества падений со второго дня почти до минимума, увеличение времени удержания до практически максимальных значений (рис. 1). В то же время острая пренатальная гипоксия в предродовой период вызывала выраженные нарушения обучения у животных обоих полов: время удержания на вращающемся стержне было в 1,6–1,8 раз ниже на всех этапах обучения и достоверно отличалось от контрольных значений у самцов; количество падений, напротив, изначально было в 1,7–3,5 раза выше и сохранялось достоверно более высоким на протяжении всего периода обучения, то есть адаптация к увеличению скорости вращения барабана практически отсутствовала. Животные обоих полов часто теряли равновесие при переходе на переменную скорость, что свидетельствует о дефиците сенсомоторной интеграции и нарушении формирования устойчивых двигательных паттернов (рис. 1).

Анализ параметров воспроизведения и сохранения моторных навыков на 4-е и 11-е сутки тестирования, соответственно, не выявил влияний фактора «день» ни у самок, ни у самцов. При этом самки всех экспериментальных групп продемонстрировали схожий результат обучения, показав сравнительно высокое время удержания на стержне: у ПГ(10) и ПГ(20), соответственно, $231,5 \pm 44,8$ с и $165,7 \pm 20,3$ с на 4-е сут; $189,3,5 \pm 42,6$ с и $161,4 \pm 21,2$ с на 11-е сут (рис. 2, А и Б).

У самцов значимым оказался фактор «группа» ($F(2,35) = 7,9$; $p = 0,002$). Самцы, пережившие пренатальную гипоксию в предродовой период, обучались хуже: латентный период падения, как и пройденная дистанция, у них был в среднем, в 2 раза ниже, чем в остальных экспериментальных группах (рис. 2, В и Г).

самки



самцы

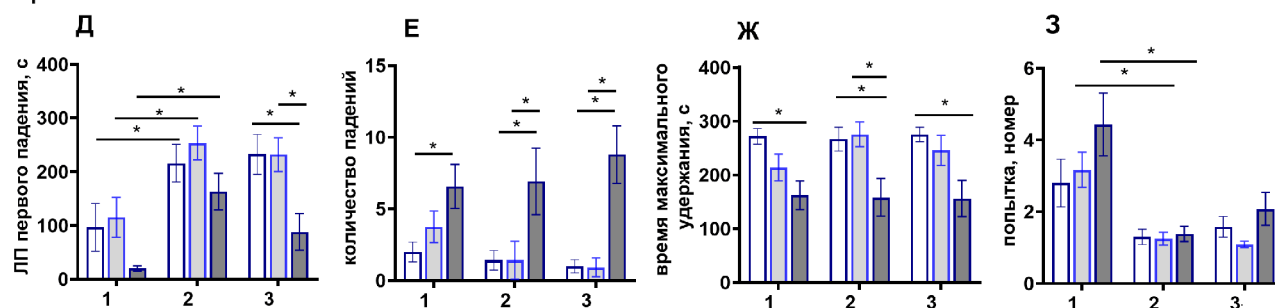


Рис. 1. Влияние острой пренатальной гипоксии на показатели моторного обучения у крыс перипубертатного возраста.

Условные обозначения: ПГ(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сут гестации; ПГ(20) – острая пренатальная гипоксия на 20-е сут гестации. 1, 2, 3 – сут обучения, соответствующие 28–30-м сут постнатального развития.

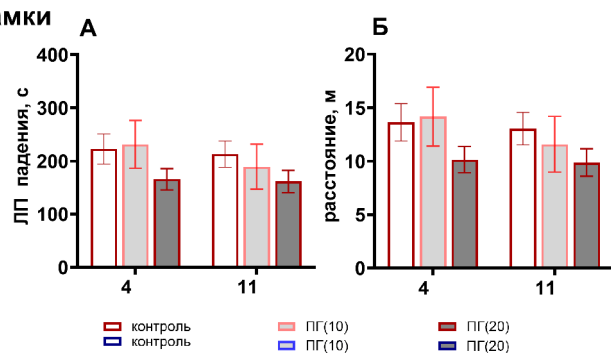
* – значимые различия ($p < 0,05$)

Контроль – самки: $n = 15$, самцы: $n = 12$

ПГ(10) – самки: $n = 11$, самцы: $n = 12$

ПГ(20) – самки: $n = 16$, самцы: $n = 14$

самки



самцы

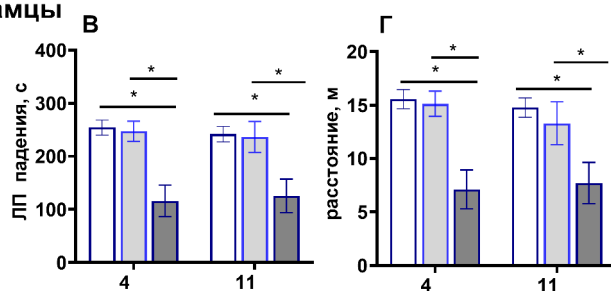


Рис. 2. Влияние острой пренатальной гипоксии на воспроизведение и сохранение навыков моторного обучения у крыс перипубертатного возраста.

Условные обозначения: 4, 11 – сут тестирования, соответствующие 31-м и 38-м сут постнатального развития.

* – значимые различия ($p < 0,05$)

Остальные условные обозначения и размер экспериментальных групп см. рис. 1.

К моменту тестирования в обеих экспериментальных группах сохранялось отставание животных по весу от контрольных, однако достоверных корреляций между весом крысят и временем их удержания на вращающемся стержне обнаружено не было: $R_s = -0,19$ для контрольной, $R_s = -0,22$ и $R_s = -0,04$ для групп ПГ(10) и ПГ(20).

2. Влияние острой пренатальной гипоксии на показатели пространственного обучения крыс перипубертатного возраста. Обучение в Т-образном лабиринте выявило для обоих полов значимость фактора «день» по всем исследуемым показателям и фактора «группа» по количеству ошибок, времени реакции и успешно выполненным попыткам. Животные обоих полов контрольной группы и группы ПГ(10) показали сходную динамику обучения: постепенное уменьшение времени принятия решения и времени выполнения реакции, сокращение количества ошибок и увеличение числа успешно выполненных попыток. Однако у самцов, переживших острую пренатальную гипоксию на 10-е сут гестации, в 1-е и 2-е сут обучения количество успешно выполненных попыток было, соответственно, в 1,3 ($p = 0,02$) и 1,2 раза ($p = 0,049$) ниже, чем в контрольной группе. При этом самки из этой же группы в 1-е сутки обучения тратили примерно в 2 раза ($p < 0,0001$) меньше времени на поиски приманки, нежели контрольные живот-

ные. Самки, пережившие пренатальную гипоксию в предродовой период, в целом имели схожую с контрольными животными динамику обучения, в то время как у самцов этой группы были выявлены явные нарушения обучения: достоверно, в 1,4–1,9 раз, более высокое число ошибок на протяжении практически всего периода обучения и увеличение времени выполнения пищедобывательной реакции в 1,7–2,3 раза, значимое во все дни обучения (рис. 3).

По результатам двух видов обучения именно детеныши мужского пола, пережившие острую предродовую гипоксию, оказались наиболее чувствительными к ее воздействию, продемонстрировав в месячном возрасте как дефицит обучения, воспроизведения и сохранения моторных навыков, так и ухудшение решения когнитивной задачи в лабиринте, в то время как гипоксия периода раннего органогенеза практически не повлияла на способность животных перипубертатного возраста к моторному и пространственному обучению.

3. Проверка сохранения навыков моторного обучения в перипубертатный период у взрослых крыс обоих полов. В возрасте 10 нед. у животных был проведен анализ сохранения моторных навыков обучения в тесте «Ротарод» и сравнение их с животными того же возраста, предварительно не обучавшимися на вращающемся стержне. Время

удержания на барабане и пройденное расстояние у всех самок, проходивших обучение в перипубертатном периоде, значимо не отличались от аналогичных показателей в половозрелом возрасте, а также от значений для животных, ранее не обучавшихся (рис. 4, А и Б).

У взрослых контрольных самцов время удержания на вращающемся стержне и пройденная дистанция, отражающие эффективность обучения, были значимо ниже, чем в возрасте 4–5 нед., а у самцов, не обучавшихся ранее, — еще ниже (рис. 4, В и Г). В то же время у половозрелых самцов, подвергнувшихся гипоксии на стадии органогенеза и обучавшихся в перипубертатном возрасте, отсутствует характерное для контрольных животных снижение параметров обучения. А у самцов, переживших предродовую гипоксию, различий в проявлении моторных навыков между перипубертатным и половозрелым возрастом не зафиксировано, независимо от того, обучались животные ранее или нет. Примечательно, что и в этом возрасте самцы, пережившие гипоксию внутриутробно, достоверно уступали в весе контрольным животным: $264,8 \pm 8,5$ г для ПГ(10) и $274,6 \pm 7,6$ г для ПГ(20) против $318,8 \pm 10,4$ г в контроле, однако достоверные корреляции между весом и временем удержания отсутствовали во всех экспериментальных группах.

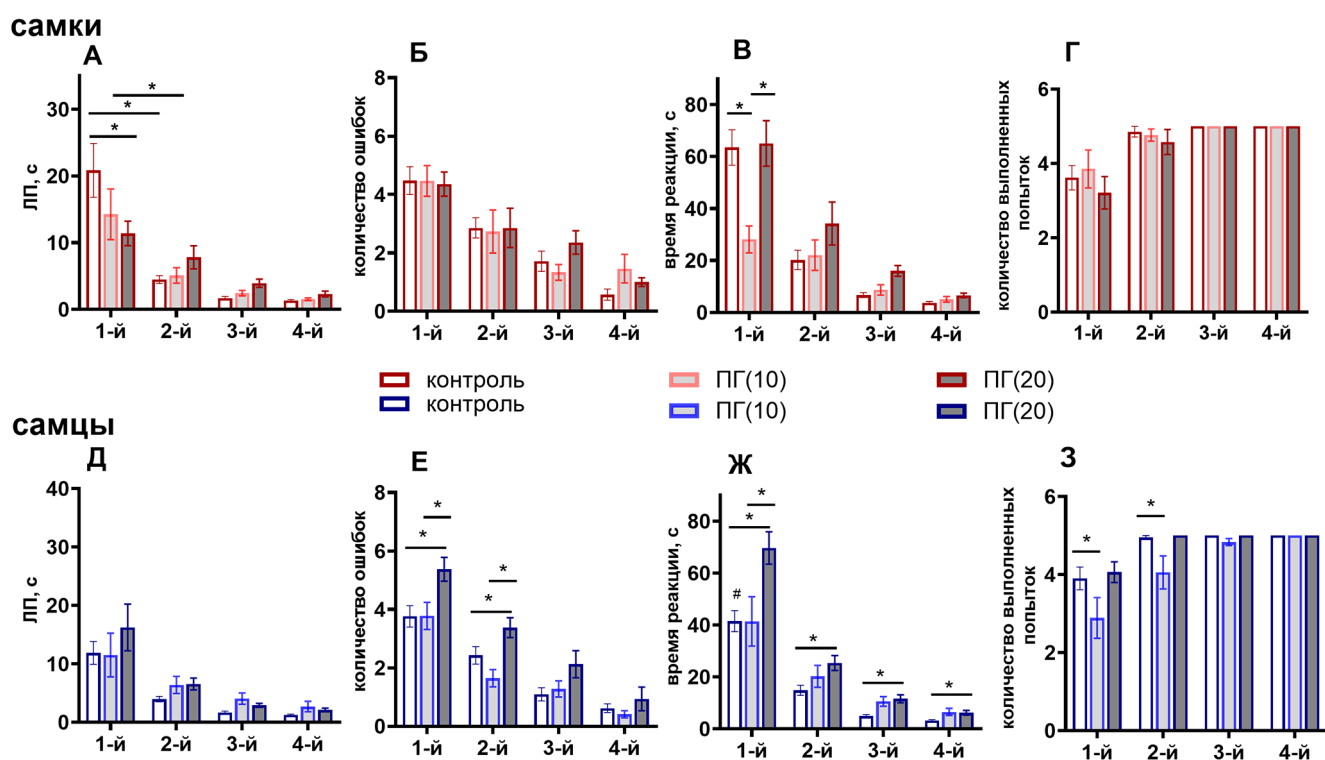


Рис. 3. Влияние острой пренатальной гипоксии на показатели пространственного обучения в Т-образном лабиринте у крыс перипубертатного возраста.

Условные обозначения: 1, 2, 3, 4 – сутки обучения, соответствующие 31–34-м сут постнатального развития. Остальные условные обозначения см. рис. 1.

* – значимые различия ($p < 0,05$)

Контроль – самки: $n = 19$, самцы: $n = 20$

ПГ(10) – самки: $n = 15$, самцы: $n = 18$

ПГ(20) – самки: $n = 16$, самцы: $n = 14$

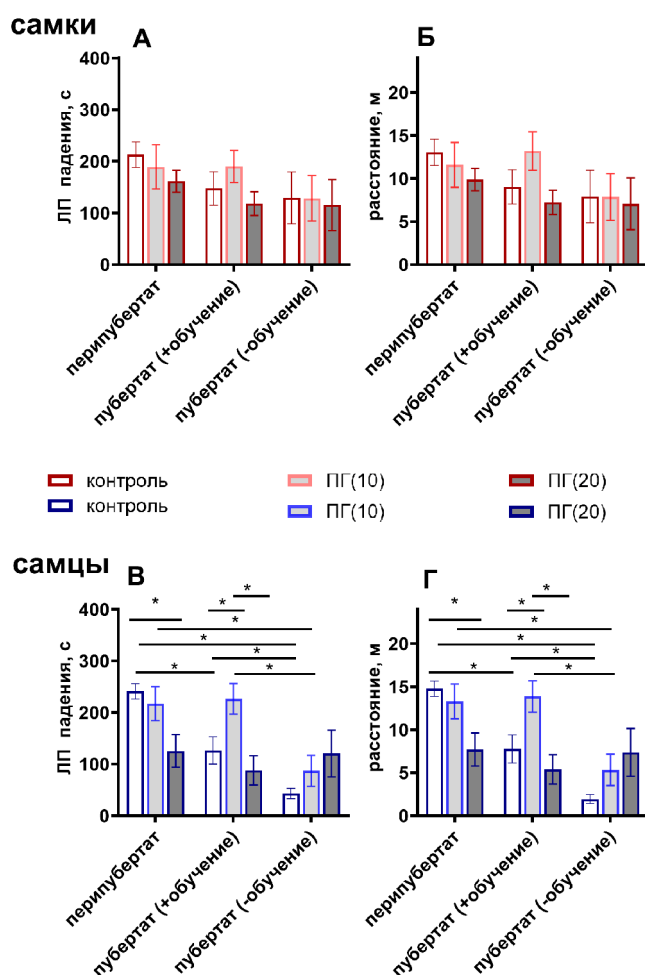


Рис. 4. Влияние предварительного обучения на сохранение моторных навыков, приобретенных в перипубертатном возрасте, у половозрелых крыс.

Условные обозначения: «+обучение» — животные, проходившие обучение в установке «Ротарод» в перипубертатный период; «-обучение» — животные, не проходившие обучение в установке «Ротарод» в перипубертатный период.

* — значимые различия между экспериментальными группами ($p < 0,05$)

Остальные условные обозначения и размер экспериментальных групп «+обучение» см. рис. 1.

Контроль («-обучение») — самки: $n = 11$, самцы: $n = 17$

ПГ(10) («-обучение») — самки: $n = 10$, самцы: $n = 10$

ПГ(20) («-обучение») — самки: $n = 10$, самцы: $n = 10$

Таким образом, самцы, пережившие острую гипоксию как в период раннего органогенеза, так и предродовый период, продемонстрировали сохранение навыков обучения, а в первом случае показали даже более высокую эффективность обучения, чем контрольные.

Обсуждение

Современные данные нейробиологии свидетельствуют о критической зависимости формирования нервной системы от условий внутриутробного развития, нарушения которого могут привести к «пренатально запрограммированным отклонениям психического здоровья» [8, 9]. Особый интерес представляет феномен временной из-

бирательности воздействия стрессорных факторов, когда один и тот же стрессор в разные периоды гестации может оказывать принципиально различное, зачастую противоположное, влияние на когнитивное развитие [10]. Настоящее исследование было сосредоточено на сравнительном анализе последствий острой пренатальной гипоксии, индуцированной на двух ключевых этапах органогенеза — раннем (10-е сут) и предродовом (20-е сут) периодах гестации. Оба периода относятся к критическим для развития нервной системы: 10-е сут внутриутробного развития у крыс (примерно 18-20-е сут эмбрионального развития у человека) соответствуют началу нейруляции, когда происходит закладка основных структур ЦНС, включая нервную трубку и зачатки гиппокампа; 20-е сут (примерно 24-я нед. эмбрионального развития человека) — стадии активного кортикогенеза. В пренатальном периоде мозг плода находится в стадии активной морфологической дифференциации, формируются ключевые нейрональные структуры и сети, что делает эмбрион особенно чувствительным к гипоксическим воздействиям. Гипоксия в это время может приводить к нарушению нейрогенеза и миелинизации [11], повреждению клеток гиппокампа и коры головного мозга [12], дисбалансу нейротрансмиттерных систем [13], а также повышению уровня катехоламинов и глюкокортикоидов, что негативно сказывается на формировании стресс-ответа и памяти [14].

Полученные результаты подтверждают, что даже кратковременное снижение поступления кислорода к плоду в критические периоды гестации способно вызывать долговременные негативные последствия для ЦНС потомства. Особенно чувствительными к гипоксическому воздействию животные оказываются в предродовый период, когда завершается формирование основных нейрональных связей и происходит подготовка к самостоятельной жизнедеятельности. При этом использование модифицированной методики моторного обучения с поэтапным усложнением задания и расширенным набором параметров регистрации позволило выявить минимальные нарушения моторной координации и обучаемости.

Перипубертатный период — переходная фаза развития между ювенильным периодом и половой зрелостью — связан с масштабной перестройкой мозга под влиянием начинающегося выделения половых гормонов. У грызунов и человека этот период является критическим для постнатального развития мозга, характеризуется значительными гормональными, физиологическими и поведенческими изменениями, а также уникальным балансом нейробиологической зрелости, когда уже завершается основное созревание гиппокампа и префронтальной коры, но сохраняется высокая нейропластичность, что создает, в том числе, идеальные условия для обучения.

Животные контрольной группы и пережившие острое кислородное голодание в период раннего органогенеза быстро осваивали задание в тесте «Ротарод», что свидетельствует о сохранности у вторых адаптационных механизмов и способности к формированию устойчивых двигательных паттернов. У крыс, перенесших гипоксию в предродовой период, особенно у самцов, был отмечен выраженный дефицит способности к обучению моторным навыкам, что указывает на нарушение сенсомоторной интеграции и может быть связано с повреждением мозжечка, базальных ганглиев и других структур, ответственных за координацию движений. Схожая картина, выявленная при обучении в лабиринте, может быть следствием повреждения также гиппокампа и фронтальной коры. Полученные результаты подтверждают важность учета пола и срока гестации при изучении структурных и функциональных изменений, обусловленных пережитой внутриутробно гипоксией.

В то же время пережившие предродовую гипоксию самцы, которые в перипубертате обучались заметно хуже контрольных, став половозрелыми, продемонстрировали стойкое сохранение приобретенных навыков, что может отражать активацию компенсаторных механизмов. Исходя из данных литературы, в качестве таких механизмов можно предположить, например, индукцию эпигенетических модификаций (метилование ДНК, гистонов и пр.), которые модулируют экспрессию генов, связанных с нейропластичностью [15] или активацию сиртуина 3 [13], для которого показана вовлеченность в нейропротекцию, долговременную потенциацию, оптимизацию энергетического метаболизма [16].

Самки всех экспериментальных групп, включая переживших предродовую гипоксию, продемонстрировали более высокую устойчивость к последствиям недостатка кислорода, что может быть связано с особенностями гормонального статуса, лучшей нейропротекцией и большей пластичностью женского мозга в раннем возрасте [17]. В перипубертатный период уровень половых гормонов начинает расти, хотя еще нет циклических колебаний, эстрогены уже усиливают когнитивные функции и обеспечивают стабильность когнитивных процессов; кроме того, эстрогены могут оказывать более выраженное антиоксидантное действие, нивелируя эффекты гипоксии [18].

Ключевую роль в нейропластичности мозга могут играть и половые различия в уровнях активности BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Известно, что по сравнению с самцами у самок крыс более высокий уровень BDNF в гиппокампе, коре головного мозга и миндалевидном теле [19], а клинические данные свидетельствуют о более высоком уровне BDNF в префронтальной коре [20]. Половые гормоны, в первую очередь эстроген, усиливают экспрессию BDNF [21], возможно, поэтому

именно у самок BDNF в большей степени связан с нейропротекцией и восстановлением после травм, в том числе после гипоксически-ишемического повреждения мозга, что объясняет их большую устойчивость к нейродегенеративным заболеваниям и лучшую способность к обучению в некоторых контекстах. Таким образом, повышенная нейропластичность у самок, вероятно, обусловлена комбинацией гормональных, структурных и молекулярных адаптаций, обеспечивающих большую гибкость синаптических сетей в ответ на изменения среды и стресс [22].

Проверка навыков моторного обучения через месяц после тестирования также показала, что у самок всех экспериментальных групп, проходивших обучение в перипубертатный период, показатели сохранялись на высоком уровне и во взрослом возрасте. Примечательно, что у перенесших гипоксию самцов моторные навыки также сохранялись, а у переживших кислородное голодание на этапе раннего органогенеза, были даже лучше, чем в контроле. Действительно, гипоксия на ранних стадиях развития может стимулировать пролиферацию нейральных предшественников в субвентрикулярной зоне и зубчатой извилине гиппокампа [23], что, в свою очередь, приводит к увеличению числа нейронов и улучшенной интеграции новых клеток в нейронные сети, а также коррелирует с повышением способности к обучению [24]. «Положительные эффекты» гипоксии раннего органогенеза могут быть связаны также с андроген-зависимыми механизмами нейропротекции, так как показано, что тестостерон и его метаболиты могут модулировать активность NMDA-рецепторов и BDNF-сигналинг, что усиливает синаптическую пластичность и приводит к улучшению когнитивных функций у взрослых [25].

Полученные данные демонстрируют, что пренатальная гипоксия, независимо от срока ее воздействия, приводит к задержке внутриутробного развития, в результате чего животные рождаются с меньшим весом. Если предположить, что гипоксия вызывает дефицит АТФ вследствие нарушения окислительного фосфорилирования в митохондриях и, соответственно, нарушение синтеза белка, то такие организмы изначально запрограммированы на экономию энергии. При выполнении сложной моторной задачи на вращающемся стержне поддерживать интенсивную мышечную работу сложнее более тяжелым особям, так как им требуется больше энергии для поддержания и перемещения своей массы. Поэтому среди животных с поврежденной энергетикой наиболее легкие, выполняя задачу на выносливость, могут продержаться на стержне дольше. Однако отсутствие достоверных корреляций между весом и параметрами моторного обучения в группах, подвергнутых кислородному голоданию, делает более вероятным воздействие пренатальной гипоксии на

области мозга, отвечающие за моторный контроль: базальные ганглии, мозжечок, моторную кору, что приводит к нарушению не силы, а координации и эффективности движений. При этом высокие результаты одной из экспериментальных групп, продемонстрированные при сохранении ранее приобретенных навыков, указывают на активацию компенсаторных нейропластических механизмов.

Заключение

В целом полученные результаты подчеркивают критическую роль сроков гипоксического воздействия и биологического пола в программировании нейрогенеза. В зависимости от сопутствующих факторов острая пренатальная гипоксия может оказывать как адаптогенное, так и патогенное влияние на способность животных к обучению в постнатальном периоде. Компенсаторные механизмы ранней пренатальной гипоксии у самцов открывают новые перспективы для исследования нейропластичности, а выявленные гендер-зависимые особенности, вероятно, имеют существенное кли-

ническое значение для оценки тяжести нарушений и разработки дифференцированных реабилитационных стратегий. Сочетание моторных и когнитивных тестов, позволяющее более полно оценить последствия гипоксического повреждения мозга, что особенно важно для ранней диагностики и разработки программ реабилитации, можно предложить в качестве целевой стратегии при изучении механизмов поведенческих нарушений.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Оборудование, использованное в исследовании, предоставлено МГУ в рамках федерального проекта «Развитие инфраструктуры науки и образования» (Соглашение №359). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Комиссией по биоэтике МГУ (номер протокола 137-д, дата утверждения 11.11.2021). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sidorova I.S., Nikitina N.A., Unanyan A.L., Ageev M.B. Development of the human fetal brain and the influence of prenatal damaging factors on the main stages of neurogenesis. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*. 2022;22(1):35–44.
2. Kostovic I., Judas M. Embryonic and fetal development of the human cerebral cortex. *Brain Mapping*. 2015;2:167–175.
3. Piešová M., Mach M. Impact of perinatal hypoxia on the developing brain. *Physiol. Res*. 2020;69(2):199–213.
4. Orzeł A., Unrug-Bielawska K., Filipecka-Tyczka D., Berbeka K., Zeber-Lubecka N., Zielińska M., Kajdy A. Molecular pathways of altered brain development in fetuses exposed to hypoxia. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(12):10401.
5. Mabry S., Wilson E.N., Bradshaw J.L., Gardner J.J., Fadeyibi O., Vera E Jr., Osikoya O., Cushen S.C., Karamichos D., Gouloupoulou S., Cunningham R.L. Sex and age differences in social and cognitive function in offspring exposed to late gestational hypoxia. *Biol. Sex Differ*. 2023;14(1):81.
6. Graf A., Trofimova L., Ksenofontov A., Baratova L., Bunik V. Hypoxic adaptation of mitochondrial metabolism in rat cerebellum decreases in pregnancy. *Cells*. 2020;9(1):139.
7. Shiotsuki H., Yoshimi K., Shimo Y., Funayama M., Takamatsu Y., Ikeda K., Takahashi R., Kitazawa S., Hattori N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J. Neurosci. Methods*. 2010;189(2):180–185.
8. Howard L.M., Khalifeh H. Perinatal mental health: a review of progress and challenges. *World Psychiatry*. 2020;19(3):313–327.
9. Gennaro S., Melnyk B.M., Szalacha L.A., Gibeau A.M., Hoying J., O'Connor C.M., Cooper A.R., Aviles M.M. Effects of two group prenatal care interventions on mental health: an RCT. *Am. J. Prev. Med*. 2024;66(5):797–808.
10. Lautarescu A., Craig M.C., Glover V. Prenatal stress: Effects on fetal and child brain development. *Int. Rev. Neurobiol*. 2020;150:17–40.
11. Wang B., Zeng H., Liu J., Sun M. Effects of prenatal hypoxia on nervous system development and related diseases. *Front. Neurosci*. 2021;15:755554.
12. Lu G., Rili G., Shuang M. Impact of hypoxia on the hippocampus: a review. *Medicine (Baltimore)*. 2025;104(12):e41479.
13. Graf A.V., Maslova M.V., Artiukhov A.V., Ksenofontov A.L., Aleshin V.A., Bunik V.I. Acute prenatal hypoxia in rats affects physiology and brain metabolism in the offspring, dependent on sex and gestational age. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(5):2579.
14. Stratilov V., Potapova S., Safarova D., Tyulkova E., Vetrovoy O. Prenatal hypoxia triggers a glucocorticoid-associated depressive-like phenotype in adult rats, accompanied by reduced anxiety in response to stress. *Int. J. Mol. Sci*. 2024;25(11):5902.
15. Monteleone M.C., Pallarés M.E., Billi S.C., Antonelli M.C., Brocco M.A. In vivo and in vitro neuronal plasticity modulation by epigenetic regulators. *J. Mol. Neurosci*. 2018;65(3):301–311.
16. Xu H., Liu Y.-Y., Li L.-S., Liu Y.-S. Sirtuins at the crossroads between mitochondrial quality control and neurodegenerative diseases: structure, regulation, modifications, and modulators. *Aging Dis*. 2023;14(3):794–824.
17. McCarthy M.M., Nugent B.M., Lenz K.M. Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nat. Rev. Neurosci*. 2017;18(8):471–484.
18. Bale T.L., Epperson C.N. Sex differences and stress across the lifespan. *Nat. Neurosci*. 2015;18(10):1413–1420.
19. Bland ST, Schmid MJ, Der-Avakian A, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF. Expression of c-fos and BDNF mRNA in subregions of the prefrontal cortex of male and female rats after acute uncontrollable stress. *Brain Res*. 2005;1051(1–2):90–99.
20. Hayley S., Du L., Littelljohn D., Palkovits M., Faludi G., Merali Z., Poulter M.O., Anisman H. Gender and brain regions specific differences in brain derived neuro-

trophic factor protein levels of depressed individuals who died through suicide. *Neurosci. Lett.* 2015;600:12–16.

21. Spencer-Segal J.L., Tsuda M.C., Mattei L., Waters E.M., Romeo R.D., Milner T.A., McEwen B.S., Oga-wa S. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience*. 2012;202:131–146.

22. Hyer M.M., Phillips L.L., Neigh G.N. Sex differences in synaptic plasticity: hormones and beyond. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:266.

23. Li G., Liu J., Guan Y., Ji X. The role of hypoxia in stem cell regulation of the central nervous system: From em-

bryonic development to adult proliferation. *CNS Neurosci. Ther.* 2021;27(12):1446–1457.

24. Herculano-Houzel S. Numbers of neurons as biological correlates of cognitive capability. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017;16:1–7.

25. Spritzer M.D., Roy E.A. Testosterone and adult neurogenesis. *Biomolecules*. 2020;10(2):225.

Поступила в редакцию 20.06.2025

После доработки 02.10.2025

Принята в печать 30.10.2025

RESEARCH ARTICLE

The comparative analysis of motor and spatial learning dynamics in animals survived prenatal hypoxia

A.V. Graf* , M.V. Maslova , A.S. Maklakova 

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

*e-mail: grafav@my.msu.ru

The data of modern neurobiology indicates a critical dependence of the nervous system formation upon the conditions of intrauterine development. Pregnancy, childbirth and the early post-natal period are of key importance for normal maturation of the nervous system. The developing fetus is especially vulnerable to the effects of adverse external and internal factors in periods of brain and neuronal structures morphological differentiation, during childbirth and the transition to independent breathing. Fetal and/or newborn hypoxia is considered one of the main causes of disorders in brain development, manifested later in form of cognitive impairments, problems with learning, memory and attention, social interactions, movements and emotions. The aim of the present study was to investigate the effect of prenatal hypoxia, suffered in periods critical for brain development and maturation, on the ability of white rats to motor and spatial learning. It was shown that males, survived acute late gestational hypoxia, turned out to be more sensitive to its effects, demonstrating at the age of one month both a deficit in learning, reproduction and maintainance of motor skills, and a failure in solving cognitive task in T-shaped maze. At the same time acute hypoxia of the early organogenesis period had practically no effect on the ability of peripubertal animals to motor and spatial learning. Therefore, comprehensive testing allows to assess the effects of hypoxic brain damage more completely, which is important for early diagnosis and the development of rehabilitation programs.

Keywords: perinatal hypoxia, intrauterine programming, peripubertal period, motor learning, spatial learning, neuroplasticity

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University. The equipment used was provided by MSU within the framework of federal project “The development of infrastructure for science and education” (Agreement №359).

Сведения об авторах

Граф Анастасия Викторовна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: nastjushka@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3579-8089>

Маслова Мария Вадимовна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: maslova_masha@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8499-5433>

Маклакова Анастасия Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: a_maklakova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8508-6231>



Определение старения: прошлое, настоящее и возможное будущее*

А.Н. Хохлов 

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Анализируются различные представления о “правильном” определении старения. Подчеркивается, что за последние десятилетия таких определений появилось огромное количество, а научных публикаций, посвященных этому вопросу, в Интернете можно найти несколько миллионов. При этом определения большинства ученых-геронтологов основывались на положении, согласно которому (с теми или иными модификациями) старение — это совокупность возрастных изменений организма, приводящих к увеличению вероятности смерти. Однако по мере появления многочисленных новых данных в геронтологических исследованиях многие специалисты начали сомневаться в том, что такое «классическое» определение их устраивает. Это было связано, в том числе, с выявленным влиянием длительных хронических заболеваний типа ВИЧ или COVID-19 на возрастную динамику смертности, с кардинальными изменениями за последние десятилетия представлений о клеточном старении и о взаимосвязи старения с различными возраст-зависимыми болезнями, а также о корректной методологии определения биологического возраста. Не последнюю роль сыграли также очевидное отсутствие до настоящего времени успехов фундаментальной геронтологии и появление большого количества работ, в которых наличие/отсутствие старения изучаемых организмов никак не было связано со снятием кривых выживания. Рассматриваются эволюция подходов к определению того, что такое старение, а также возможные перспективы модификации этого определения в будущем.

Ключевые слова: старение, клеточное старение, продолжительность жизни, биологический возраст, долголетие, корректные определения

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-8

Как ни печально, но вопросов в этой короткой статье будет, по-видимому, больше, чем ответов, однако удержаться от ее написания я не смог — уж очень животрепещущей является для меня тема, вынесенная в заголовок. При этом я прекрасно понимаю, что научных публикаций, затрагивающих данную проблему, в Интернете можно найти несколько миллионов! И надо заметить, что их очень активно читают, скачивают и цитируют. Однако, на мой взгляд, это не очень помогло геронтологам в расшифровке фундаментальных механизмов старения, а также в поиске средств для его замедления/предотвращения. И, как я уже писал ранее, мы по-прежнему не живем не то что 1000, а даже 150 лет [1, 2]

В течение многих лет в своих публикациях [3–7] я подчеркивал необходимость корректного определения старения для проведения «правильных» геронтологических исследований — в частности, работ, направленных на изучение потенциальных геропротекторов [8–10]. Еще Рене Декарт в своем труде «Правила направления ума», написанном в 1628 г., но опубликованном впервые только после его смерти в 1701 г., писал: «Определяйте значения слов — и вы избавите свет от половины его заблуждений» [11].

Скажем, в геронтологической литературе часто упоминается идея, согласно которой старение — это болезнь. Эта идея мне совсем не кажется правильной. Известно, что частота так называемых

* Статья основана на лекции, прочитанной автором в рамках Международной научной конференции «Антистарение: наука и практика здорового долголетия» в рамках VIII Международного научного конгресса «Глобалистика», посвященного 270-летию МГУ имени М.В. Ломоносова, 220-летию Московского общества испытателей природы, 80-летию Великой Победы и учреждения ООН «ООН и глобальные трансформации международных отношений: многополярность, устойчивость и безопасность», 10–25 октября 2025 г.

«возрастных» заболеваний увеличивается с возрастом. Не очень понятно, как с возрастом должна увеличиваться частота болезни под названием «старение». И как построить кривую ее зависимости от возраста и поставить такой диагноз? Или, возможно, это заболевание не является «возрастным»? Может ли врач сказать пациенту, что он болен старением и можно попробовать его от него вылечить? Или он должен сказать: «Вы неизлечимо больны старением, и шансов на выздоровление у вас нет»? Хотелось бы также взглянуть на пациента, у которого просто нет такого заболевания (например, из-за врожденного иммунитета к нему). Мне кажется, что в случае любой болезни можно найти хотя бы несколько индивидов, которые ей никогда не болели. Впрочем, разделить влияние старения на болезни и болезней на старение довольно трудно, о чем уже много было написано в соответствующих публикациях [12]. Мы так и не можем понять, заболеваем ли мы возрастными болезнями (в первую очередь сердечно-сосудистыми или онкологическими) из-за старения или стареем вследствие появления у нас этих заболеваний, частота которых может просто зависеть от времени.

Надо сказать, что вопросом о корректном определении старения интересовались практически все известные ученые-геронтологи на протяжении многих десятилетий. Как я уже отмечал ранее [1, 6], практически в каждой книге, посвященной вопросам старения и долголетия, авторы уделяли этой проблеме особое внимание. Убедиться в этом очень легко — достаточно просмотреть классические монографии по биологии старения, написанные самыми авторитетными специалистами в данной области. В их числе (перечисляю в хронологическом порядке появления книг) — Бернард Стрелер [13], Александр Комфорт [14], Марион Лэмб [15], Майкл Роуз [16], Калейб Финч [17], Леонард Хейфлик [18], Робин Холидей [19] и многие другие.

У всех упомянутых авторов определение старения (с теми или иными небольшими вариациями) основывалось на понятии об увеличении вероятности смерти с возрастом. Именно это явление по мнению геронтологов-«классиков» и являлось краеугольным камнем науки о старении. В частности, создатель свободнорадикальной теории старения, Денхам Харман, в своей статье 2006 г. [20] написал: «Старение — это прогрессирующее накопление с течением времени разнообразных вредных изменений, которые увеличивают вероятность возникновения болезней и смерти».

Однако другой всемирно известный геронтолог, Стивен Остад, в своей опубликованной в 2004 г. работе «Возражение на статью Бредесена «Несуществующая программа старения: как она работает?» [21] приводит вот такое определение старения: «Старение — это генерализованное, зависящее от времени нарушение фенотипической це-

лостности». И здесь о вероятности смерти уже речи не идет. Впрочем, в замечательном обзоре 2005 г. «Различные темпы старения у многоклеточных: цели функциональной геномики» [22] Остад уже дает следующее — «более правильное», как мне представляется — определение старения: «Старение, или физиологическое старение, — это прогрессирующее ухудшение физиологических функций, происходящее по мере того, как взрослые индивиды становятся все старше и старше, что в конечном итоге приводит к ухудшению здоровья и благополучия, а также к увеличению частоты дегенеративных заболеваний и смерти». В то же время Остад не учитывает ситуацию с длительными хроническими заболеваниями, которые безо всякого старения приводят к увеличению смерти с возрастом. Но мне импонирует упоминание в этом определении «взрослых индивидов», ибо оно позволяет не учитывать возрастание смертности со временем у хронически больных детей и подростков, а также не имеющий отношения к старению феномен высокой детской смертности.

Хочу еще раз повторить, что в последние годы появилось очень большое количество статей, посвященных проблеме «правильного» определения старения, что с очевидностью свидетельствует об актуальности этой проблемы. В Google Scholar можно найти несколько миллионов (!) таких публикаций. Во многих из них слова «определение старения» даже вынесены в заголовок [23, 24]. А в некоторых — не вынесены, но этому вопросу посвящена значительная часть текста [25–28]. Хотя в большом количестве работ речь идет не столько об определении старения, сколько об его описании. Скажем, Леонард Хейфлик (автор концепции старения *in vitro*, или репликативного старения) в одной из своих статей [25] отмечает, что «Старение — это артефакт цивилизации», имея в виду старение как самих людей, так и животных, которых они содержат в своих домах и зоопарках, и подчеркивая, что в дикой природе большинство животных умирает еще до начала старения.

К сожалению, по мере появления многочисленных новых данных геронтологических исследований многие специалисты начали сомневаться в том, что «классическое» определение старения их устраивает, и пытаться ввести модифицированные его варианты.

Однако я хотел бы перечислить основные проблемы, мешающие, на мой взгляд, созданию корректного определения старения:

Проблема №1 — это кажущаяся очевидность того, что такое старение, для большинства обычных людей и даже ученых-геронтологов. В Московском университете имени М.В. Ломоносова я читаю для студентов общеуниверситетский (для всех факультетов университета) курс «Основы биологии старения, или все, что вы хотели знать о старении (но боялись спросить)» [5]. Как оказа-

лось, ни один слушатель не может дать определение старения или «научно» объяснить, каким образом он отличает старого человека от молодого. И они совершенно не понимают, зачем нужно давать определение термину «старение», который «абсолютно понятен любому идиоту». Как ни печально, этому способствует и ставшее популярным среди некоторых геронтологов представление о том, что старение начинается с эмбриона [29].

Проблема №2 — в настоящее время в геронтологической англоязычной литературе очень часто смешиваются понятия «aging» и «senescence», что создает определенную путаницу в головах читателей, хотя в классическом варианте «aging» — это любые изменения при увеличении возраста, а «senescence» — лишь накопление вредоносных возрастных изменений, снижающих жизнеспособность организма.

Проблема №3 — это смешение понятий «старение» и «механизмы старения». Эта проблема затрагивает, как ни странно, даже очень многих всемирно известных геронтологов, с которыми я общался. Например, часто встречается точка зрения, согласно которой старение — это накопление в организме повреждений ДНК, увеличение содержания холестерина [30], укорочение теломер и т.п. При этом мои слова о том, что это лишь возможные механизмы старения, определение которого так и не дано моими собеседниками, ничего, кроме раздражения, никогда у них не вызвали. Кстати, как ни удивительно, но теломерная концепция старения до сих пор чрезвычайно популярна у большого количества геронтологов, хотя сами авторы этой теории (А.М. Оловников, Л. Хейфлик и др.) давно от нее отказались. Поразительно, как долго идея о теломерном механизме старения держится в сознании людей даже после ее опровержения авторами! Ну не из-за укорочения теломер мы стареем! В наших самых важных органах (мозг и сердце) основные функции возложены на постмитотические клетки (нейроны и кардиомиоциты), для которых репликативное старение, обусловленное укорочением теломер, практически не имеет смысла.

Проблема №4 — это некорректное использование понятия «биологический возраст», который обычно привязывают только к хронологическому возрасту, но не к вероятности смерти. В то же время, как известно, хорошая корреляция какого-то физиологического параметра с хронологическим возрастом (например, для седины коэффициент такой корреляции — один из самых высоких) совсем не означает его хорошей корреляции с силой смертности, а именно это должно интересовать геронтологов в первую очередь.

Проблема №5 — ситуация с понятием «клеточное старение». Я уже подробно рассматривал ранее вопрос об эволюции этого выражения [31]. К сожалению, к единому определению данного

термина так и не удалось прийти до настоящего времени. В «классическом» варианте идеи клеточного старения подразумевалось, что клетки «стареют» благодаря некоему внутреннему механизму, благодаря которому возникают различные макромолекулярные дефекты (в первую очередь — повреждения ДНК). Фактически, именно так функционируют механизмы маргинотомии Оловникова, приводящей к укорочению теломер нормальных клеток, или механизмы хронологического/«стационарного» старения клеточных культур [4, 32] при ограничении их роста, вызванном контактным торможением. Однако в настоящее время, как правило, под клеточным старением подразумевают накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, для которых репликативное старение не характерно) определенных «биомаркеров старения» под воздействием различных внешних факторов (окислительный стресс, H_2O_2 , митомицин С, этанол, ионизирующее излучение, доксорубицин и др.), вызывающих повреждения ДНК. Это явление получило название DDR (DNA Damage Response — реакция на повреждения ДНК). Мне не кажется такой подход оправданным, ибо он уводит нас в сторону от понимания истинных механизмов старения многоклеточных организмов. Кроме того, часто встречается (в частности, при описании старения одноклеточных организмов) точка зрения, согласно которой клетка стареет, стареет, стареет..., а потом делится и дает начало двум молодым дочерним клеткам. Не думаю, что такой процесс оправданно считать старением. Впрочем, в разработанной нами модели «стационарного старения» [4, 32, 33] с экспоненциальным ростом вероятности смерти клеток, находящихся в стационарной фазе роста [34], все в порядке. Они действительно вымирают «по Гомпертцу» — так же, как стареющие многоклеточные организмы.

Один мой коллега сказал мне что, по его мнению, огромное количество научных работ, посвященных клеточному старению (в самом разном смысле этого понятия), затормозило мировую геронтологию лет на 50, т.к. отвлекло геронтологов от изучения животных и людей, переключив их на более быстрые, удобные и не столь затратные (в смысле как денег, так и времени) исследования.

Многие исследователи посчитали необходимым изменить свои определения старения, работая над проблемой биологического возраста и занимаясь поиском потенциальных геропротекторов [9, 10].

Хочу подчеркнуть, что изучение геронтологами биологического возраста, привязанного к оценке различных «биомаркеров старения», совсем не заменяет снятие кривых выживания, позволяющих зафиксировать возрастное нарастание смертности. К сожалению, на сегодняшний день других корректных способов это сделать не существует.

На рисунке представлено несколько вариантов кривых выживания когорт живых организмов (дополнительные пояснения — в подписи к рисунку). В случае «нормального» старения (рисунок, А) выживание когорты идет в соответствии с функцией Гомпертца (1), предполагающей экспоненциальное увеличение силы смертности с возрастом:

$$R = \frac{dN}{dt \cdot N} = \frac{-d}{dt} \ln N, \quad (1)$$

где R — сила смертности, а N — число выживших к моменту времени t .

Возможны также отсроченное (рисунок, Б) или преждевременное (рисунок, В) — например, радиационно-индуцированное (при небольших дозах облучения) — старение, которые, соответственно, начинаются позже или раньше, но описываются кривыми, сходными с «нормальной» кривой выживания, т.е. обладающими теми же эксцессом и асимметрией. Если кривая выживания идет вниз гораздо круче, чем в норме, то мы имеем дело с ускоренным старением (рисунок, Г).

Еще две кривые на рисунке (Д и Е) описывают ситуации с отсутствием старения, когда сила смертности не меняется со временем. В случае Д она всегда равна нулю, а в случае Е — является ненулевой постоянной величиной (dN/dt и N снижаются пропорционально и тогда мы видим вымирание «по экспоненте»). Кривая Г (ускоренное старение) не обязательно должна быть прямой линией, как на рисунке — достаточно, чтобы она шла выше экспоненты. Кстати, своих студентов я часто спрашиваю, как они могут интерпретировать кривую выживания в виде прямой линии, соединяющей оси ординат и абсцисс. Большинство отвечает, что такая кривая описывает отсутствие старения, ибо величина dN/dt здесь все время не-

изменна. Однако они забывают про то, что в данном случае N все время уменьшается, так что сила смертности все равно растет со временем, хотя и не экспоненциально, как при «нормальном» старении, а линейно. Наконец, очень странно выглядящая кривая необычной формы (рисунок, Ж) представляет собой просто плод моего воображения и описывает выживание некой «аномальной» когорты, подверженной влиянию непонятных случайных факторов, выявление которых требует очень скрупулезного анализа всех данных этого эксперимента.

Конечно, представленными на рисунке кривыми выживания все их варианты не исчерпываются. В частности, на нем нет «ректангуляризованной» кривой, когда почти все особи доживают до определенного момента времени, а потом сразу умирают. Нечто близкое к такому варианту мы видим в развитых странах. Кроме того, отсутствует вариант «растянутой» кривой с резко увеличенной максимальной продолжительностью жизни, до которой доживают лишь немногочисленные особи, при этом средняя продолжительность жизни остается практически такой же, как при «нормальном старении». И т.д., и т.п.

Мое «личное» определение старения непрерывно модифицировалось на протяжении нескольких десятилетий. Вот этапы этой модификации:

1. *Старение — это увеличение вероятности гибели организма с возрастом.* Такое чисто математически-статистическое определение мне не нравилось из-за отсутствия в нем упоминания каких-либо биологических событий.

2. *Старение — это совокупность возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятности его гибели.* Это определение продержалось дольше других.

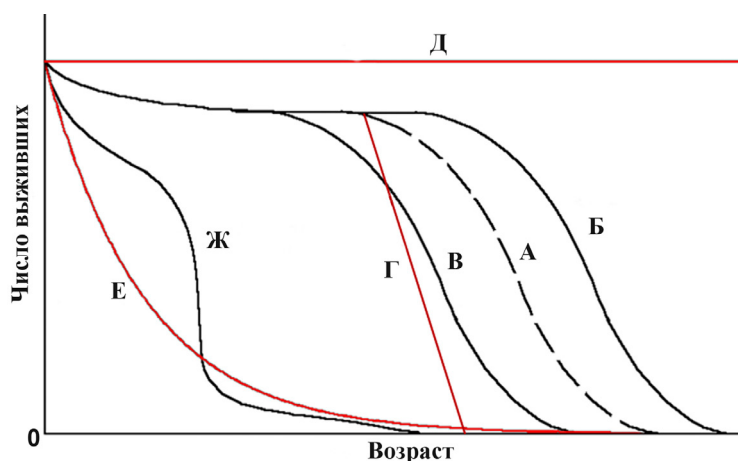


Рисунок. Схематическое изображение нескольких вариантов кривых выживания живых организмов. А — «нормальное» старение в соответствии с функцией Гомпертца; Б — отсроченное старение (форма кривой та же, что и при «нормальном» старении, но снижение численности выживших начинается позже); В — преждевременное старение (форма кривой та же, что и при «нормальном» старении, но снижение численности выживших начинается раньше); Г — ускоренное старение (снижение численности выживших происходит быстрее, чем при «нормальном» старении); Д — отсутствие старения (сила смертности равна нулю в любом возрасте); Е — отсутствие старения (сила смертности не равна нулю и не меняется с возрастом); Ж — некий аномальный вариант кривой выживания, корректная интерпретация которого либо вообще невозможна, либо требует очень скрупулезного анализа ситуации с используемой для исследования когортой.

3. *Старение — это совокупность возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятности его гибели (уровня смертности, силы смертности).* Здесь просто добавилось небольшое пояснение термина “вероятность гибели”.

4. *Старение — это совокупность возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятности его гибели (уровня смертности, силы смертности) в отсутствие очевидных признаков патологии.* В этом варианте было учтено, что при длительных хронических болезнях типа ВИЧ или COVID-19 вероятность смерти может повышаться со временем безо всякого старения.

5.

Думаю, пока все ученые, работающие в самых разных областях геронтологических исследований, не придут к согласию о том, что такое старение, борьба с ним будет бесконечным поиском черной кошки в темной комнате (как вы, возможно, помните, ее там нет...). Правда, шансы на такое «согласие» представляются мне весьма призрачными.

Можно надеяться, что, как уже много раз было написано в соответствующих статьях [2, 35], объединение усилий «фундаменталистов» (изучающих клеточные, молекулярные и биохимические механизмы старения) и «гериатров» (занимающихся разработкой методов лечения пожилых пациентов) все-таки позволит нам сдвинуться с мертвой точки как в борьбе со старением, так и в поиске эффективных средств воздействия на возрастные болезни. Впрочем, на сегодняшний день успехи «фундаменталистов» представляются

мне гораздо более призрачными, чем возможные достижения «гериатров». И кстати, не в последнюю очередь — из-за разброса в определениях. Видимо, поэтому популярность статей в клинических журналах на порядок выше, чем публикаций в журналах, посвященных фундаментальным биомедицинским исследованиям.

Заключение

Итак, главная модификация определения старения, на мой взгляд, должна на сегодняшний день выглядеть вот так:

Старение — это совокупность возрастных изменений организма, ведущих к увеличению вероятности его гибели (уровня смертности, силы смертности) в отсутствие очевидных признаков патологии.

Эта модификация хоть и последняя, но, по-видимому, не окончательная. Поэтому в пункте 5 приведенного выше списка моих «личных» определений и стоит многоточие.

Складывается впечатление, что решением сформулированных в этой статье вопросов геронтологам придется все-таки серьезно заниматься в последующие годы.

Автор благодарен Галине Моргуновой за ее неоценимую помощь в оформлении рукописи статьи.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № 121032300215-6), без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии у него конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khokhlov A.N. Reflections of a pessimistic gerontologist or why we still do not live 1000 years. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021;76(4):239–243.
2. Khokhlov A.N. The renewed ‘Advances in Gerontology’ 2025: Results, prospects, changing strategy. *Adv. Gerontol.* 2025;15(2):43–45.
3. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies. *Biophysics.* 2010;55(5):859–864.
4. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors. *Curr. Aging Sci.* 2013;6(1):14–20.
5. Khokhlov A.N. Basics of biology of aging for MSU non-biologists. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(2):111–114.
6. Khokhlov A.N. Gerontology in the 21st century: From failures to advances. Hopefully. *Adv. Gerontol.* 2023;13(1):1–3.
7. Khokhlov A.N. Why freshwater hydra does not get Alzheimer’s disease. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(3):198–204.
8. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(2):59–62.
9. Khokhlov A.N. and Morgunova G.V. Should we consider water and antibiotics to be geroprotectors? *Adv. Gerontol.* 2023;13(4):202–205.
10. Khokhlov A.N. Antioxidants: Good, bad, or ineffective in terms of aging and lifespan? It depends. *Adv. Gerontol.* 2024;14(4):171–174.
11. Descartes R. Règles pour la direction de l’esprit. Vrin, 1970. 146 p.
12. Анисимов В.Н. Старение и ассоциированные с возрастом болезни. *Клин. геронтол.* 2005;11(1):42–49.
13. Strehler B.L. *Time, cells and aging*. NY: Acad. Press, 1962. 270 pp.
14. Comfort A. *Ageing: The biology of senescence*. NY: Holt, Rinehart and Winston, 1964. 365 pp.
15. Lamb M.J. *Biology of ageing*. Glasgow: Blackie, 1977. 184 pp.
16. Rose M. *Evolutionary biology of aging*. NY: Oxford Univ. Press, 1991. 221 pp.
17. Finch C.E. *Senescence, longevity, and the genome*. Chicago: Univ. Chicago Press, 1990. 922 pp.
18. Hayflick L. *How and why we age*. NY: Ballantine Books, 1994. 377 pp.
19. Holliday R. *Aging: The paradox of life. Why We Age*. Springer Science and Business Media, 2007. 134 pp.

20. Harman D. Free radical theory of aging: an update. Increasing the functional life span. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006;1067(1):10–21.
21. Austad S.N. Rebuttal to Bredesen: ‘The non-existent aging program: how does it work?’. *Aging Cell.* 2004;3(5):253–254.
22. Austad S.N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics. *Mech. Ageing Dev.* 2005;126(1):43–49.
23. Flatt T. A new definition of aging? *Front. Genet.* 2012;3:148.
24. Lemoine M. Defining aging. *Biol. Philos.* 2020;35(5):46.
25. Hayflick L. The future of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):267–269.
26. Rose M.R., Flatt T., Graves J.L., Greer L.F., Martinez D.E., Matos M., Mueller L.D., Shmookler Reis R.J., Shahrestani P. What is aging? *Front. Genet.* 2012;3:134.
27. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194–1217.
28. Mori M.A. Aging: a new perspective on an old issue. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2020; 92(2):e20200437.
29. Gladyshev V.N. The ground zero of organismal life and aging. *Trends Mol. Med.* 2021;27(1):11–19.
30. Khokhlov A.N. On the cholesterol theory of aging-2022. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(4):292–296.
31. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cyto gerontological research. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013;68(4):158–161.
32. Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Signs of similarities and differences in cellular models of aging: A scoping review. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(3):139–146.
33. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992;663:475–476.
34. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(4):185–190.
35. Demaria M. Rethinking healthcare through aging biology. *Aging (Albany NY).* 2025;17(5):1077–1079.

Поступила в редакцию 05.10.2025

После доработки 29.10.2024

Принята в печать 06.11.2025

OPINION ARTICLE

Defining aging: Past, present, and possible future

A.N. Khokhlov 

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

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

Various views on the “correct” definition of aging are analyzed. It is emphasized that a huge number of such definitions have emerged in recent decades, and several million scientific publications devoted to this topic can be found online. At the same time, most gerontologists based their definitions on the premise that aging (with various modifications) is a set of age-related changes in the body that lead to an increased probability of death. However, as numerous new data emerged in gerontological research, many specialists began to question the suitability of this “classical” definition. This was due, among other things, to the identified impact of long-term chronic diseases such as HIV or COVID-19 on age-related mortality dynamics, to the dramatic changes in recent decades in the understanding of cellular aging and the relationship between aging and various age-related diseases, as well as to the correct methodology for determining biological age. The apparent lack of progress in fundamental gerontology to date and the emergence of a large number of studies in which the presence / absence of aging in the studied organisms was in no way linked to the obtaining survival curves also played a significant role. The evolution of approaches to defining aging is discussed, as well as potential future modifications to this definition.

Keywords: *aging, cell senescence, lifespan, biological age, longevity, correct definitions*

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

Сведения об авторе

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7454-7023>

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская — в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии в 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](#)