

СОДЕРЖАНИЕ

Том 141, номер 2, 2021

Ассоциация между эволюционной консервативностью длинных некодирующих РНК и присутствием CPG-островов <i>И. А. Сидоренко, И. Б. Rogozin, В. Н. Бабенко</i>	107
Поражение сосудистого эндотелия как ведущий механизм системной патологии COVID-19 <i>О. А. Гомазков</i>	118
Способ моделирования миастении у грызунов посредством индукции аутоиммунного поражения холинорецепторов <i>С. В. Чепур, М. А. Юдин, А. С. Никифоров, И. М. Иванов, А. Н. Алексеев, Т. М. Устинова</i>	128
Некоторые аспекты современного состояния проблемы пренатального стресса и роль окислительного стресса в реализации его последствий <i>А. В. Вьюшина, Н. Э. Ордян</i>	133
Современные представления о токсинах высших грибов: высокомолекулярные белки <i>А. А. Ховпачев, В. А. Башарин, С. В. Чепур, С. В. Волобуев, М. А. Юдин, А. С. Гоголевский, А. С. Никифоров, Л. Б. Калинина, М. А. Тюнин</i>	149
Определение свободной и связанной воды в растительных тканях с различным осмотическим давлением, сравнительный анализ метода высушивания над водоотнимающей средой и дифференциальной сканирующей калориметрии <i>Р. В. Малышев</i>	164
Функции ионоцитов и гормональная регуляция ионного обмена у рыб <i>Н. Л. Рендаков</i>	172
Гипотеза о механизмах эволюционного процесса и его канализации на примере позвоночных животных. Часть 2. Некоторые механизмы эволюционного процесса у позвоночных <i>В. А. Черлин</i>	189

Contents

Vol. 141, No. 2, 2021

Association between the lncRNA Conservation and CPG Islands Persistence <i>I. A. Sidorenko, I. B. Rogozin, V. N. Babenko</i>	107
Vascular Endothelium Damage as a Leading Mechanism of COVID-19 Systemic Pathology <i>O. A. Gomazkov</i>	118
Method for Modeling Myasthenia Gravis in Rodents by Inducing Autoimmune Cholinoreceptor Damage <i>S. V. Chepur, M. A. Yudin, A. S. Nikiforov, I. M. Ivanov, A. N. Alekseev, T. M. Ustinova</i>	128
Some Aspects of the Current State of Prenatal Stress and the Role of Oxidative Stress in the Realisation of Its Consequences <i>A. V. Vyushina, N. E. Ordyan</i>	133
Actual Concepts of Higher Fungi's Toxins: High Molecular Weight Proteins <i>A. A. Khovpachev, V. A. Basharin, S. V. Chepur, S. V. Volobuev, M. A. Yudin, A. S. Gogolevsky, A. S. Nikiforov, L. B. Kalinina, M. A. Tyunin</i>	149
Definitions of Free and Bound Water in Plants, a Comparative Analysis of the Drying Method over a Dewatering Agent and Differential Scanning Calorimetry <i>R. V. Malyshev</i>	164
Hormonal Regulation of Ion Exchange in Fish <i>N. L. Rendakov</i>	172
The Hypothesis on Mechanisms of the Evolutionary Process and Its Canalization on the Example of Vertebrate Animals. Part 2. Some Mechanisms of the Evolutionary Process in Vertebrates <i>V. A. Cherlin</i>	189

УДК 575.89

АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ЭВОЛЮЦИОННОЙ КОНСЕРВАТИВНОСТЬЮ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК И ПРИСУТСТВИЕМ CPG-ОСТРОВОВ¹

© 2021 г. И. А. Сидоренко¹, И. Б. Рогозин^{1,2}, В. Н. Бабенко^{1,3, *}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Национальные институты здоровья, Роквилл Пайк, Бесезда, США

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

Поступила в редакцию 02.10.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принята к публикации 02.10.2020 г.

Гены длинных некодирующих РНК (lncRNA) в большом количестве представлены у млекопитающих, но их функции остаются в значительной степени неизвестными. Одним из возможных способов их изучения является использование крупномасштабных сравнений различных характеристик lncRNA с характеристиками кодирующих белок генов, для которых имеется множество функциональной информации. Характерной особенностью белок-кодирующих генов у млекопитающих является высокая эволюционная консервативность последовательностей экзонов. Хотя консервативность ДНК-последовательностей экзонов lncRNA не столь выражена, как у белок-кодирующих генов, но, тем не менее, она существенно выше, чем у интронов генов lncRNA. Мы оценили консервативность указанных характеристик с помощью множественного выравнивания четырех млекопитающих — человека, шимпанзе, мыши и крысы. Была проведена разметка экзон-интронной структуры каждого гена некодирующей lncRNA, а также их промоторной части (300 п.н.), и вычислена консервативность по позициям полных выравниваний. Исследование связи консервативности генов lncRNA и наличием/отсутствием CpG-островов (CGI) выявило более высокую консервативность генов lncRNA, которые локализованы рядом с CGI. Эта тенденция может быть причиной выявленной ранее ассоциации между консервативностью и уровнем экспрессии lncRNA. Важной задачей также являлась классификация выборок по типу lncRNA (сенс-, антисенс-, межгенных РНК, и псевдогенных локусов). Выяснилось, что lncRNA, находящиеся в белок-кодирующем локусе в прямой цепи (сенс-lncRNA), обладают наибольшим количеством промоторных CGI. На втором месте по встречаемости CGI были псевдогены, и на третьем месте — антисенс-lncRNA. Межгенные lncRNA обладали наименьшей долей CGI. Это позволило сделать вывод, что CGI-острова более присущи промоторам кодирующих генов, нежели некодирующих. Оценка консервативности CGI-островов путем сравнения геномов человек–мышь по наличию ортологичных CGI выявила степень их консервативности около 45%. Оценка консервативности еще раз подтвердила наличие ген-специфичных сигналов в некодирующих РНК. Расширение репертуара ген-специфичных сигналов для lncRNA с помощью CGI было сделано впервые, насколько известно авторам.

Ключевые слова: некодирующая РНК, эволюция, CpG-острова, экзоны, интроны, консервативность

DOI: 10.31857/S0042132421020083

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время растет внимание к длинным некодирующим РНК (lncRNA) — сравнительно недавним объектам изучения в области геномики. В то время, как роль многих некодирующих молекул РНК (рибосомных, транспортных

(tRNA), малых ядершковых (snoRNA), микро-(miRNA) и piwi) уже определена, функции lncRNA остаются в значительной степени неопределенными (Сидоренко и др., 2019; Goodrich, Kugel, 2006; Mercer et al., 2009; Ng et al., 2013; Kapusta, Feschotte, 2014).

Существует предположение, что основная масса lncRNA выступает побочным продуктом фоновой транскрипции (van Bakel, Hughes, 2009;

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi: 10.31857/S0042132421020083 для авторизованных пользователей.

Robinson, 2010). Это основано на их невысоком уровне экспрессии и малой эволюционной консервативности при сравнении с белок-кодирующими генами и такими малыми РНК, как miRNA и snoRNA (Marques, Ponting, 2009). В противовес этой точке зрения заметим, что часть lncRNA соответствуют эволюционно консервативным областям (Siepel et al., 2005), и существенная доля lncRNA выявляет меньшее по сравнению с остальными (некодирующими) районами число инсерций/делеций, указывая на присутствие селективного отбора (Ponjavic et al., 2007; Guttman et al., 2009; Managadze et al., 2011; Guttman, Rinn, 2012; Guttman et al., 2013; Kannan et al., 2015). При невысокой экспрессии lncRNA (Bertone et al., 2004; Amaral et al., 2013) секвенирование транскриптомов ряда видов привело к массовому обнаружению новых транскрибирующихся последовательностей. К примеру, лишь только проект FANTOM каталогизировал больше 30000 предполагаемых длинных некодирующих транскриптов в тканях мыши методом клонирования полноразмерной комплементарной ДНК (кДНК) (Liu et al., 2006).

ДНК-последовательности большинства lncRNA гораздо менее консервативны ДНК-последовательностей белок-кодирующих генов. Тем не менее, уровень их ортологичности высок: от 60 до 70% генов lncRNA считаются ортологичными у человека и мыши (Managadze et al., 2013). lncRNA показывают своеобразную субклеточную локализацию и часто экспрессируются тканеспецифично. Они являются процессированными (полиаденированными и сплайсированными) транскриптами; это позволяет предположить их функциональность (Сидоренко и др., 2019; Kapusta, Feschotte, 2014; Vance, Ponting, 2014). Другой возможный фактор функциональности lncRNA — наличие регуляторных сигналов сплайсинга, как, собственно, и самого сплайсинга (Chodroff et al., 2010; Schüler et al., 2014). Экспериментальное исследование lncRNA с уже определенной клеточной функцией выявило, что они функционируют в процессированной форме (Kapusta, Feschotte, 2014; Vance, Ponting, 2014). Сравнение около 3000 генов lncRNA мыши с ортологами крысы и человека выявило сохранение экзон-интронной структуры: 65%; и 40% |GT-AG|-сайтов сплайсинга lncRNA мыши консервативны у крысы и человека, что позволяет рассматривать сплайсинг как неотъемлемое свойство lncRNA (Ponjavic et al., 2007).

В составе класса lncRNA есть также многочисленные длинные межгенные некодирующие РНК (lincRNA), то есть молекулы РНК длиной больше 200 п.н., которые расположены за пределами белок-кодирующих локусов. Одной из наиболее изученных lincRNA считается *Xist*, которая принимает участие в инактивации X-хромосомы са-

мок плацентарных млекопитающих (Brockdorff et al., 1992; Chang et al., 2006). В частности, сообщалось, что ген *Xist* эволюционно произошел от псевдогена *Lnx3*, появившегося у ранних плацентарных. Вслед за тем последовала интеграция мобильных элементов (Duret et al., 2006; Elisaphenko et al., 2008), которые также наблюдаются в ряде других lincRNA (Kapusta et al., 2013).

Для геномов позвоночных характерно наличие большого количества CpG-островов (CGI), характеризующихся увеличенной долей CG-динуклеотидов (Gardiner-Garden, Frommer, 1987). Формальное определение CGI подразумевает три основных характеристики: процентная доля cg-динуклеотидов больше 60%; отношение $cg_obs/cg_exp > 0.6$; длина острова > 300 п.н. Упомянутое отношение видоспецифично, в частности у мыши плотность cg-динуклеотидов в CGI меньше, чем у человека (Illingworth, Bird, 2009). В геноме человека их количество составляет примерно 26 тыс. (www.genome.ucsc.edu). Медиана распределения длины CGI около 1 кб. CGI находится в промоторах 50–70% генов. Эти промоторы именуют CpG-промоторами (Babenko et al., 1999; Deaton, Bird, 2011). В генах гомеобоксов (*Hox*, *Pax*) и еще приблизительно в 5% других CpG-островов промоторов, CGI метилируются на определенной стадии или в определенной ткани ($< 6\%$ островов). В силу кооперативности, статус метилирования островов имеет U-образное распределение по их численности против доли метилирования, с подавляющим ($> 0\%$) левым плечом (гипометилирование; Zeng et al., 2014). Остальные 30–40% островов, не расположенные в промоторах генов, присутствуют во внутригенных районах (20%) и в межгенных областях (12–15%) (Deaton, Bird, 2011). Также, в силу кооперативности метилирования динуклеотидов CGI (Haerter et al., 2014), существуют способы интерполяции значений статуса метилирования подмножества нескольких CpG-динуклеотидов острова на все его CpG-динуклеотиды с учетом плотности CpG и длины острова (Zou et al., 2018).

Целью проведенной работы была оценка доли промоторов генов lncRNA, содержащих CpG-острова, для сравнения с тем же для кодирующих генов. Для этого в предоставленной работе мы поставили задачу проклассифицировать lncRNA по типу промоторов (CGI-содержащие, CGI-несодержащие (^CGI)), а также оценили консервативность промоторных районов, используя геномные выравнивания lncRNA четырех видов: человек—орангутанг—мышь—крыса. Мы также оценили уровень ассоциации консервативности длинных некодирующих генов и наличием/отсутствием CpG-островов.

Таблица 1. Распределение числа элементов в выборке lncRNA человека, попавших в анализ

Транскриптов в выборке	7941
Транскриптов, содержащих CGI	4567
Средний размер транскриптов	44086
Минимальный размер транскриптов	548
Максимальный размер транскриптов	1698418
Среднее количество экзонов	6.1
Среднее количество интронов	5.1
Число генов (CGI, ^CGI)	3091, 2735
Число генов с >1 изоформ (CGI, ^CGI)	758, 223
Число уникальных CGI (без учета дублированных генов и изоформ)	2969

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для нашего исследования были выбраны четыре вида млекопитающих: человек, шимпанзе, мышь и крыса. Множественные выравнивания геномов этих четырех видов были взяты из базы данных выравниваний UCSC (genome.ucsc.edu). В этой же базе данных были выбраны белок-некодирующие гены человека (lncRNA) длиной более 200 п.н. и состоящие из двух и более экзонов, как было предложено ранее (Cabili et al., 2011). Результирующая выборка lncRNA содержала 7941 транскриптов 5826 генов (табл. 1). В случае альтернативных изоформ соответствующий им ген в выборке был представлен максимальной по длине изоформой (число изоформ было указано, но специфицирована только одна). Геномные последовательности транскриптов lncRNA человека из результирующей выборки были пересечены с CpG-островами (CpG Island, CGI) по локализации. Затем эти районы были наложены на трек множественного выравнивания lncRNA. Анализируемый район включал в себя транскрипт, а также 300 п.н. промоторной области и 300 п.о. фланкирующего района. Использовался вариант множественного выравнивания с геномом человека (версия hg19) в качестве начального генома для построения выравнивания. В итоге было получено две выборки: lncRNA с CGI в гене и/или промоторе (CGI-выборка) и остальные lncRNA (^CGI-выборка). Статистика приведена в табл. 1.

Мы оценили число случаев, когда альтернативные lncRNA транскрипты начинались с альтернативного старта транскрипции. В случае CGI-содержащих промоторов было 26 генов, содержащих два альтернативных CGI-промотора на ген (более двух не наблюдалось). Таким образом, поскольку, в отличие от матричной РНК (mRNA), их было менее 1% от всех случаев, мы предпочли использовать гены, представленные максимальным транскриптом в части задач, связанной с оценкой консервативности, и ряда других.

Полученные на основе множественного выравнивания геномов четырех видов позиции ис-

пользовались для оценки консервативности генов lncRNA. Пропуски исключались из рассмотрения, рассматривалась позиция с остальными нуклеотидами. Исключались также те участки генов lncRNA (интроны, экзоны, промоторы, 3'-районы), где количество информативных позиций было меньше 70. Эволюционная консервативность считалась как $[1 - (\text{количество замен}) / (\text{общее количество позиций})]$. В качестве меры консервативности в каждой позиции мы использовали число замен, полученное по методу максимальной парсимонии, а именно: при наличии одинаковой замены в паре грызунов или приматов, считалось, что произошла одна общая предковая замена в соответствующей паре, а не в обоих видах.

Для анализа типов CGI с учетом вероятности и особенностей их метилирования было взято разделение статуса метилирования на 5 классов из работы (Zeng et al., 2014). После оценки распределения 5 классов CGI, в силу малочисленности дифференциально метилированных CGI-классов в нашей выборке (Zeng et al., 2014), мы исследовали только два класса CpG-островов: гипометилированные (промоторные) CGI, и негипометилированные (все остальные; табл. 2). Для CGI-выборок человека мы провели поиск ортологических CGI в мыши с помощью инструмента LiftOver (UCSC Genome Browser; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ состава CGI/^CGI-выборок

Путем сравнения имен некодирующих генных локусов lncRNA с кодирующими мы выяснили, что из 3091 (различных) генов lncRNA, содержащих в основном промоторный CGI, по крайней мере 1402 белок-кодирующих генных локуса содержат некодирующую изоформу из нашей выборки (2395 транскриптов) в той же цепи, то есть перекрывающиеся с кодирующей частью (предполагающего NMD (nonsense-mediated mRNA decay, нонсенс-опосредованный распад мРНК) — дегра-

Таблица 2. Полногеномное распределение числа CGI в геноме человека по классам метилирования (Zeng et al., 2014)

Класс	Описание класса	Число CGI	%
I	Гипометилированные (промоторные) CGI	16164	65.68
^I	Вариабельные и гиперметилированные CGI	8446	34.32

Таблица 3. Распределение числа генов lncRNA в локусах, кодирующих белки, по CGI- и ^CGI-выборкам

Категория	CGI		^CGI	
белок-кодирующий	гены	транскрипты	гены	транскрипты
Нет	1689	2395	2391	2853
Да	1402	2095	344	475
Сумма	3091	4490	2735	3328

Примечание: жирным шрифтом выделены наиболее различающиеся наборы.

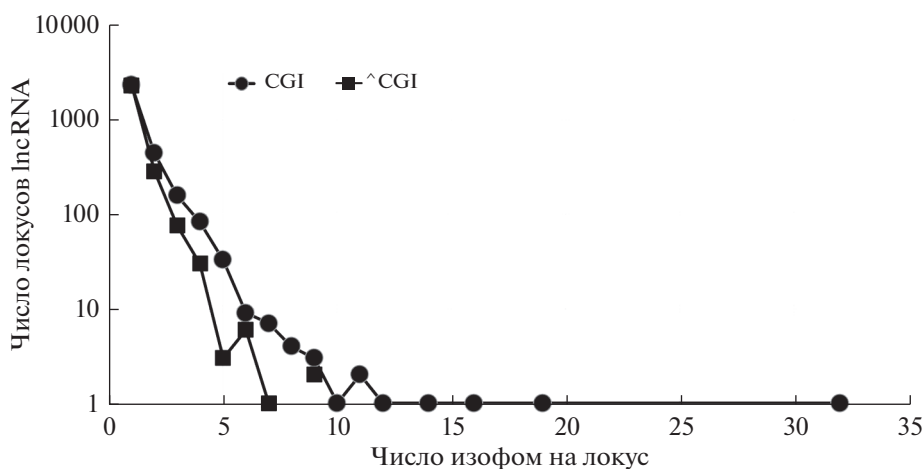
дацию; Lareau et al., 2007). Порядка 800 генов являются аннотированными антисенс-РНК. Остальные lncRNA (порядка 1000) попадают в межгенные районы или находятся в локусе белок-кодирующих генов. В табл. 3 приведены составы CGI/^CGI-выборки по распределению в генах, кодирующих белки и длинные некодирующие РНК. Заметно, что в выборке ^CGI число случаев lncRNA в белок-кодирующем локусе в 4 раза меньше, чем в CGI-содержащих генах.

Анализ альтернативного сплайсинга и экспрессии генов lncRNA

Существенно меньшее число белок-кодирующих локусов в ^CGI-выборке (344) может приводить к тому (табл. 3, выделенные значения: $1402/344 = 4$ раза), что число некодирующих изоформ на кодирующий локус значительно меньше в ^CGI-выборке по сравнению с CGI-выбор-

кой (рис. 1), что может свидетельствовать о большой интенсивности альтернативного сплайсинга lncRNA именно в кодирующих локусах. Кроме этого, подтверждается более интенсивная экспрессия lncRNA генов, содержащих CGI в промоторе.

Мы использовали базу данных GTEX (ENCODE Consortium, 2017) для исследования экспрессии транскриптов lncRNA в выборке. Как правило, высокоэкспрессирующиеся гены lncRNA являются функциональными (Niazi, Valadkhan, 2012). Мы оценили распределение величины экспрессии в транскриптах, представленных на рис. 2. Из 6718 транскриптов (1103 транскриптов не было найдено в базе данных GTEX), 3782 транскрипта вошли в состав CGI-выборки и 2930 транскриптов вошли в состав ^CGI-выборки. В качестве оценки экспрессии генов нами были взяты максимальные значения экспрессии (transcripts per million, TPM) транскрипта среди

**Рис. 1.** Распределение числа транскриптов по локусам в CGI/^CGI-выборках lncRNA. Первые 2 точки (1 изоформа, 2 изоформы) охватывают 70% генов каждой выборки.

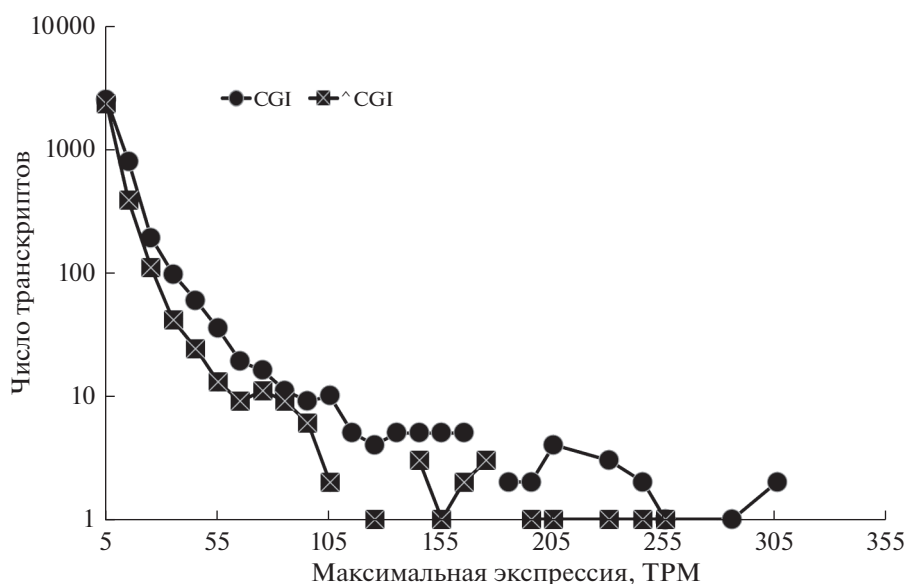


Рис. 2. Распределение числа транскриптов в зависимости от максимальной величины экспрессии транскрипта по базе данных GTEX в CGI/^CGI-выборках.

53 тканей в базе данных GTEX, результаты представлены на рис. 2. Для 67% CGI- и 79% ^CGI-выборок максимальный уровень экспрессии был менее 5 TPM (первые измерения на шкале TPM на рис. 2).

Таким образом, можно оценить, что в общей выборке около 71% транскриптов имеют экспрессию ниже 5 TPM при максимальном значении в какой-либо ткани (либеральный критерий). Это также соответствует приведенным данным в литературе по lncRNA (Niazi, Valadkhan, 2012). Необходимо отметить сходство распределения числа транскриптов по локусам в CGI/^CGI-выборках (рис. 1) и распределения числа транскриптов в зависимости от максимальной величины экспрессии транскрипта (рис. 2). Возможно, именно уровень экспрессии является основным фактором, определяющим повышенное число альтернативных изоформ в CGI-выборке.

В качестве дополнительного анализа, мы оценили группу lncRNA, у которых наблюдалась тканеспецифическая экспрессия. Она идентифицировалась по эмпирическому порогу: $stdev/avg > 1.3$, которые считались по 53 тканям в базе данных GTEX (описание процедуры приведено на Доп. рис. 1 в дополнительных материалах (доступно только в электронной версии журнала)). Мы смогли найти 117 lncRNA в GTEX по экспрессии в 53 тканях, приведенных в табл. 4, удовлетворяющих этому критерию. Стоит заметить, что lncRNA из этой группы экспрессируются крайне тканеспецифично, и, при этом, с высоким уровнем экспрессии (см. Доп. мат., Приложения 1, 2). Наибольшее число тканеспецифичных генов на-

блюдались в семенниках (53 транскрипта), а также в поджелудочной железе (5 транскриптов; см. Приложения). Высокий уровень тканеспецифической экспрессии генов lncRNA отмечался ранее (Kapusta, Feschotte, 2014; Vance, Ponting, 2014; Postnikova et al., 2019). Наличие большого количества альтернативных изоформ lncRNA, которые частично перекрываются с белок-кодирующими экзонами (сенс-lncRNA), может быть связана с регуляцией экспрессии белок-кодирующих генов (Kapusta, Feschotte, 2014; Vance, Ponting, 2014; Postnikova et al., 2019).

Распределение CGI по статусу метилирования

Используя данные (Zeng et al., 2014; табл. 2), мы произвели идентификацию статуса метилирования CGI, попавших в нашу выборку. Результаты приведены в табл. 5.

В табл. 5 указано число генов, перекрывающихся с CGI разными генными компартментами. Из нее можно сделать вывод, что наибольшее число метилированных островов (32%) находятся в 3'-районах, наименьшее (5.6%) — в промоторах,

Таблица 4. Число тканеспецифичных транскриптов lncRNA, выявленных по профилю GTEX-экспрессии

Категория	CGI	^CGI
Число транскриптов	65	44
Семенники	29 (30%)	24 (35%)
Общее число	94	68
Средний уровень экспрессии, TPM	535	160

Таблица 5. Число перекрытия CGI с генными сегментами в CGI-выборке. I – гипометилированные (промоторные) CGI, ^I – вариабельные и гиперметилированные CGI

Категория	I	^I	N/A	Всего
3'-фланкирующие районы	44	21	7	72
Экзоны	1768	188	274	2230
Интроны	1556	305	260	2121
Промоторы	1717	104	250	2071
Всего	5085	618	791	6494

Таблица 6. Распределение числа транскриптов с одним и более CGI в каждом из 4-х компартментов (3'-фланкирующие районы, экзоны, интроны, промоторы)

Число сегментов на CGI	Число транскриптов
1	1031
2	1780
3	1642
4	37

16% CGI метилированы в интронах, 9% – в экзонах. Это в целом соотносится с теми же показателями в кодирующих генах (в промоторах кодирующих генов 3.6% метилированных CGI, в 3'-районах – 61%, в экзонах – 17%, и в интронах – 14%).

Перекрытие CGI с lncRNA по сегментам гена

Поскольку число физических (различных) CGIs в исследуемой выборке всего 2969 (табл. 1), а число попаданий в экзоны, интроны и промоторы ненамного меньше этого числа (1556–1768), то ожидаемая частота попадания (перекрытия) одного CGI трех (начальных) сегментов гена – около 60% (табл. 5). Только небольшое число CGI находится в 3'-районе (табл. 5, рис. 3).

Мы оценили распределение одновременного перекрытия CGI с 1–4 сегментами гена: 3'-

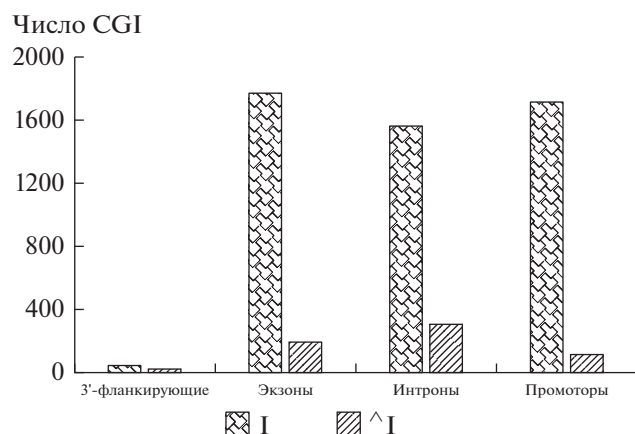


Рис. 3. Распределение числа метилированных и гипометилированных CGI в выборке CGI (табл. 5).

фланкирующие районы, экзоны, интроны, промоторы, приведенные в табл. 6. Большинство промоторных CGI одновременно перекрывается с экзоном и интроном. Учитывая, что ген в нашей выборке содержит по крайней мере 2 и более экзона (среднее – 6; табл. 1), среднее число перекрытий сегментов – 2.4 на ген lncRNA (как можно вычислить из табл. 6).

Оценка промоторного потенциала по базе данных GeneHancer

Мы оценили качество и количество промоторных областей lncRNA двух выборок. Для этого мы использовали данные промоторного потенциала, вычисленные в работе (Fishilevich et al., 2017) по семи источникам данных, включая хроматиновые метки, EqtI-данные, данные конформационного анализа хроматина и позиции относительно гена среди 38 тканей. Мы выяснили, что 2677 генов из 3091 (табл. 1) CGI-выборки найдена в базе данных GeneHancer, для выборки ^CHI – 1926 генов из 2973. В зависимости от активности и подтверждения промоторного статуса по семи типам данных, а также его присутствия в различных типах клеток, каждый промотор оценивался по шкале от 1 до 1000 (z-score; Haeussler et al., 2019). Путем пересечения таблицы промоторов GeneHancer с CpG-островами CGI-выборки мы установили, что 2455 генов из 2677 доступных имеют CGI в промоторном сегменте, аннотированном в GeneHancer. Для выборки ^CGI 1118 генов из 1926 доступных имеют аннотированный в GeneHancer промотор в пределах –300...+300 п.н.

При оценке промоторного потенциала каждой из выборок мы наблюдали следующую картину: в выборке ^CGI не было выраженного пика, в медиане величина была равна 120 (из 1000 максимальных баллов) (рис. 4), в то время как в выборке CGI наблюдался пик при значении промоторного потенциала 500 (рис. 5).

Здесь же мы оценили число генов lncRNA, имеющих 2 альтернативных CGI-промотора, их оказалось 26 (в основном, антисенс-РНК): MEF2C-AS1, HOXB-AS3, ZNF718, LOC441242, MAP3K14-AS1, LEF1-AS1, TRAM2-AS1, LOC100507557, MSTO2P, CBR3-AS1, EGFL7, LINC01159, MAGI2-AS3, LIPE-AS1, KCTD2, LOC101929340, EPS15L1, THTPA, LOC100506125, DHRS4L1, MIR124-2HG, PGAP2, ID2-AS1, CRIP2, CYB561D2, HOXA-AS3.

Анализ консервативности lncRNA в выборках CGI и ^CGI

Эволюционная консервативность является важным индикатором функциональных районов генома (Koonin, Rogozin, 2003). Важным фактором, который может существенно влиять на консервативность lncRNA является перекрытие с белок-кодирующими мРНК, для которых повышенная консервативность является общепри-

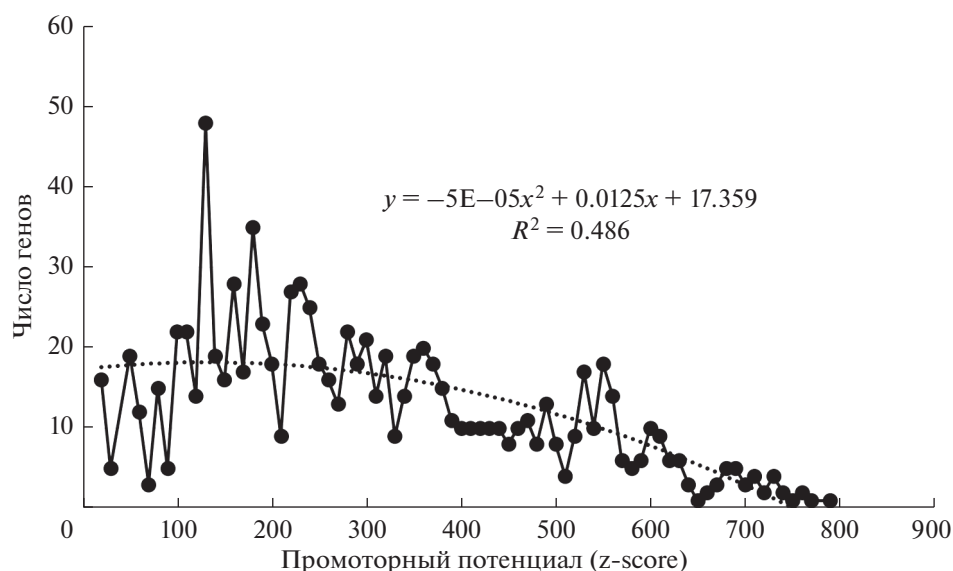


Рис. 4. Распределение промоторного потенциала (GeneHancer Database) в $\hat{\text{CGI}}$ -выборке. Мода (пик) промоторного потенциала — порядка 130, 1118 генов.

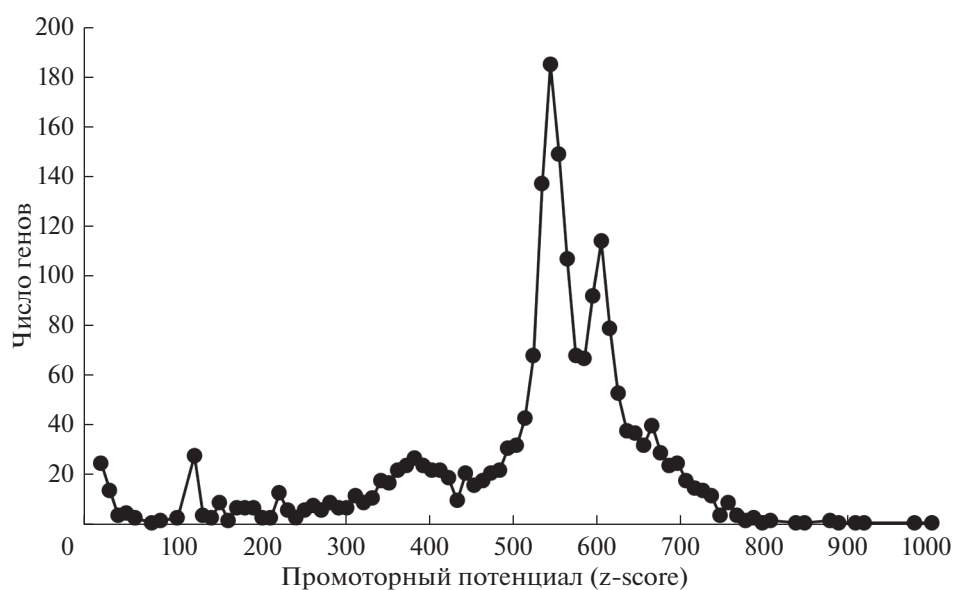


Рис. 5. Распределение промоторного потенциала (GeneHancer Database) в CGI-выборке. Пик промоторного потенциала — 550, 2455 генов.

знанным фактом (Koonin, Rogozin, 2003). Для этого выборка lncRNA была разделена на две подвыборки: lncRNA, которые перекрываются с мРНК (рис. 3) и не перекрываются с мРНК (рис. 4).

Из рис. 6 и 7 можно видеть, что фактор перекрывания с мРНК не сильно влияет на распределение консервативности. Напротив, наличие CGI-острова в промоторе lncRNA существенно увеличивает величину консервативности, особенно в экзонах (рис. 6г и 7г). На основе распределений графиков консервативности (рис. 6 и 7) мы оце-

нили достоверность отличия распределений консервативности в зависимости от наличия или отсутствия CpG-островов тестом Манна–Уитни и получили значения вероятности (P-value), приведенные в табл. 7. Видно, что вышеупомянутые свойства увеличения консервативности при наличии CGI в экзонах имеют статистически значимую поддержку вне зависимости от перекрывания с мРНК (табл. 7). Интересно, что наблюдаемая тенденция была найдена для интронов (рис. 6 и 7). Возможной причиной повышенной консер-

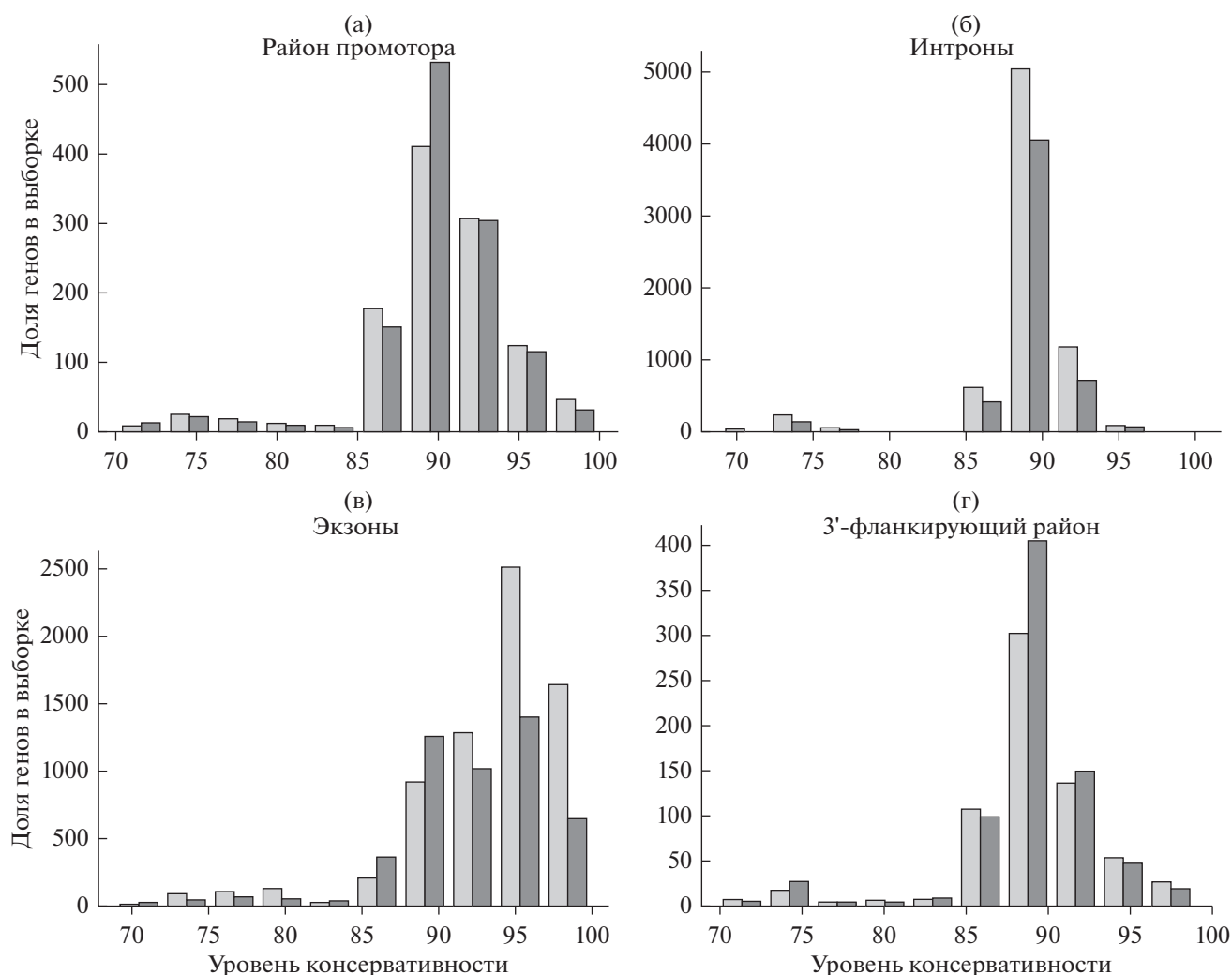


Рис. 6. Распределение уровня консервативности в промоторах (а), интронах (б), экзонах (в) и 3'-фланкирующих районах (г), содержащих (светло-серый цвет) и не содержащих CGI (темно-серый цвет) при условии перекрытия lncRNA и мРНК.

вативности интронов (не столь четко выраженной по сравнению с экзонами) может быть наличие в их составе многочисленных неаннотированных альтернативных экзонов, что согласуется с повышенной частотой альтернативных изоформ генов lncRNA, ассоциированных с CpG-островами (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Эволюционная консервативность показывает функциональную значимость районов геномной ДНК. Классическим примером является критерий отбора в белок-кодирующих генах. Критерий определяется отношением несинонимических (K_a) к синонимическим (K_s) заменам. Предполагается, что положительный отбор наблюдается при $K_a/K_s > 1$, в то время как отрицательный отбор может наблюдаться при $K_s/K_a > 1$ (Hurst,

2002). При рассмотрении генов lncRNA скорость замен экзонов (K_e) можно считать аналогичной K_a , а интронов (K_i), соответственно, — K_s (Louie et al., 2003; Hoffman, Birney, 2007; Resch et al., 2007). Селективный отбор в экзонах lncRNA потенциально может быть определен при условии $K_e/K_i < 1$.

Ранее было показано (Managadze et al., 2011), что скорость эволюции экзонов lncRNA мыши и человека значительно ниже скорости замещения интронов ($K_e/K_i < 1$). Результаты исследования говорят о том, что селективный отбор действует на экзоны генов lncRNA и согласуются с более ранними наблюдениями (Ponjavic et al., 2007; Guttman et al., 2009). Также было показано, что распределение скоростей замен значительно шире для выборки экзонов lncRNA мыши и человека, чем для выборки интронов. Это указывает на меняющуюся интенсивность селективного отбо-

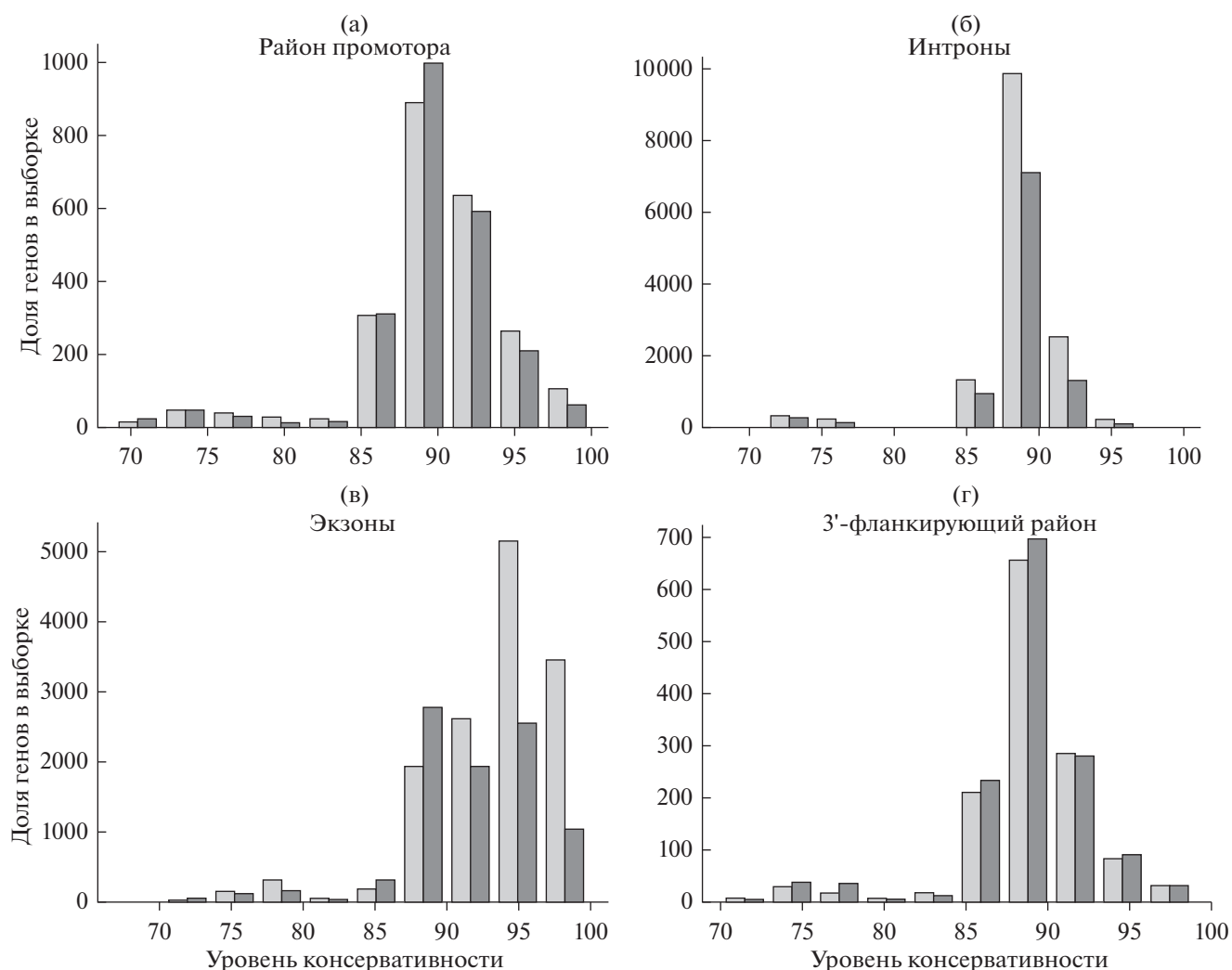


Рис. 7. Распределение уровня консервативности в промоторах (а), интронах (б), экзонах (в) и 3'-фланкирующих районах (г), содержащих (светло-серый цвет) и не содержащих CGI (темно-серый цвет) при условии неперекрывания lncRNA и мРНК.

ра на гены lncRNA. Наши результаты в целом подтверждают эти наблюдения (рис. 6 и 7).

В работе (Managadze et al., 2013) также были оценены уровни экспрессии. Исследователи выявили высокую корреляцию между уровнями экспрессии lncRNA. В экзонах lncRNA мыши и человека наблюдалась статистически значимая отрицательная корреляция между скоростью эволюции последовательности и ее уровнем экспрес-

сии. Коэффициенты корреляции в основном находились в диапазоне 0.1–0.16. Напротив, для интронов аналогичные коэффициенты корреляции были очень низкими и статистически не значимыми. Таким образом, авторами была показана отрицательная корреляция между скоростью эволюции и уровнем экспрессии lncRNA (Managadze et al., 2013).

В данной работе нами исследовалась связь консервативности генов lncRNA и наличием/от-

Таблица 7. Таблица вероятностей (P-values) сравнения распределений категорий lncRNA с наличием CGI и без CGI (рис. 6 и 7)

Категория	P-values			
	промоторы	интроны	экзоны	3'-конец
Выборка с перекрыванием с мРНК	0.11	0.017	0.0001	0.21
Выборка без перекрывания с мРНК	0.005	0.001	0.0001	0.051

сутствием CpG-островов (CGI). Была показана более высокая консервативность генов lncRNA, которые локализованы рядом с CGI. Этот результат может объяснить выявленную ранее отрицательную корреляцию между скоростью эволюции и уровнем экспрессии lncRNA (Managadze et al., 2013). Наличие или отсутствие CGI может быть причиной наблюдаемой корреляции. Однако мы не можем исключить, что более высокая консервативность генов lncRNA является следствием отрицательной корреляции между скоростью эволюции и уровнем экспрессии lncRNA. В любом случае, наличие значимых отличий между классами генов lncRNA указывает на то, что значительная доля этих генов является функционально важной и становится приоритетным кандидатом при поиске генов lncRNA, которые регулируют различные процессы в клетках млекопитающих.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке фонда Национальных институтов здоровья США (ИБР) и государственного задания АААА-А17-117072710029-7 (ВНБ).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сидоренко И.А., Rogozin И.Б., Babenko В.Н. Эволюция экзонов и экзон-интронной структуры генов длинных межгенных некодирующих РНК у плацентарных млекопитающих // *Успехи соврем. биол.* 2019. Т. 139. №3. С. 221–234.
- Amaral P.P., Dinger M.E., Mattick J.S. Non-coding RNAs in homeostasis, disease and stress responses: an evolutionary perspective // *Brief. Func. Genom.* 2013. V. 12. P. 254–278.
- Babenko V.N., Kosarev P.S., Vishnevsky O.V. Investigating extended regulatory regions of genomic DNA sequences // *Bioinformatics.* 1999. V. 15 (7–8). P. 644–653.
- Bertone P., Stolc V., Royce T.E. et al. Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays // *Science.* 2004. V. 306. P. 2242–2246.
- Brockdorff N., Ashworth A., Kay G.F. et al. The product of the mouse *Xist* gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus // *Cell.* 1992. V. 71. P. 515–526.
- Cabili M.N., Trapnell C., Goff L. et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses // *Gen. Dev.* 2011. V. 25. P. 1915–1927.
- Chang S.C., Tucker T., Thorogood, N.P. et al. Mechanisms of X-chromosome inactivation // *Front. Biosci.* 2006. V. 11. P. 852–866.
- Chodroff R.A., Goodstadt L., Sirey T.M. et al. Long noncoding RNA genes: conservation of sequence and brain expression among diverse amniotes // *Gen. Biol.* 2010. V. 11. P. R72.
- Deaton A. M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription // *Genes Dev.* 2011. V. 25. P. 1010–1022.
- Duret L., Chureau C., Samain S. et al. The *Xist* RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene // *Science.* 2006. V. 312. P. 1653–1655.
- Elisaphenko E.A., Kolesnikov N.N., Shevchenko A.I. et al. A dual origin of the *Xist* gene from a protein-coding gene and a set of transposable elements // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e2521.
- Fishilevich S., Nudel R., Rappaport N. et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards // *Database (Oxford).* 2017. <https://doi.org/10.1093/database/bax028>
- Gardiner-Garden M., Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 196 (2). P. 261–282.
- Goodrich J.A., Kugel J.F. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 7. P. 612–616.
- Guttman M., Rinn J.L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs // *Nature.* 2012. V. 482. P. 339–346.
- Guttman M., Amit I., Garber M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals // *Nature.* 2009. V. 458. P. 223–227.
- Guttman M., Russell P., Ingolia N.T. et al. Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins // *Cell.* 2013. V. 154. P. 240–251.
- Haerter J. O., Lövkvist C., Dodd G. et al. Collaboration between CpG sites is needed for stable somatic inheritance of DNA methylation states // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 2235–2244.
- Haeussler M., Zweig A.S., Tyner C. et al. The UCSC genome browser database: 2019 update // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47 (1). P. D853–D858.
- Hoffman M.M., Birney E. Estimating the neutral rate of nucleotide substitution using introns // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 522–531.
- Hurst L.D. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution // *Trends Genet.* 2002. V. 18. P. 486.
- Illingworth R.S., Bird A.P. CpG islands – 'a rough guide' // *FEBS Lett.* 2009. V. 583 (11). P. 1713–1720.
- Kannan S., Chernikova D., Rogozin I.B. et al. Transposable element insertions in long intergenic non-coding RNA genes // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015. V. 3. P. 71.
- Kapusta A., Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications // *Trends Genet.* 2014. V. 30. P. 439–452.
- Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J. et al. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. P. e1003470.
- Koonin E.V., Rogozin I.B. Getting positive about selection // *Gen. Biol.* 2003. V. 4 (8). P. 331.
- Lareau L.F., Brooks A.N., Soergel D.A. et al. The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 623. P. 190–211.
- Liu J., Gough J., Rost B. Distinguishing protein-coding from non-coding RNAs through support vector machines // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. P. e29.

- Louie E., Ott J., Majewski J. Nucleotide frequency variation across human genes // *Gen. Res.* 2003. V. 13. P. 2594–2601.
- Managadze D., Rogozin I.B., Chernikova D. et al. Negative correlation between expression level and evolutionary rate of long intergenic noncoding RNAs // *Gen. Biol. Evol.* 2011. V. 3. P. 1390–1404.
- Managadze D., Lobkovsky A.E., Wolf Y.I. et al. The vast, conserved mammalian lincRNome // *PLoS Comput. Biol.* 2013. V. 9. P. e1002917.
- Marques A.C., Ponting C.P. Catalogues of mammalian long noncoding RNAs: modest conservation and incompleteness // *Gen. Biol.* 2009. V. 10. P. R124.
- Mercer T.R., Dinger M.E., Mattick J.S. Long non-coding RNAs: insights into functions // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. P. 155–159.
- Ng S.Y., Lin L., Soh B.S., Stanton L.W. Long non-coding RNAs in development and disease of the central nervous system // *Trends Genet.* 2013. V. 29. P. 461–468.
- Niazi F., Valadkhan S. Computational analysis of functional long noncoding RNAs reveals lack of peptide-coding capacity and parallels with 3' UTRs // *RNA.* 2012. V. 18 (4). P. 825–843.
- Ponjavic J., Ponting C.P., Lunter G. Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs // *Gen. Res.* 2007. V. 17. P. 556–565.
- Postnikova O.A., Rogozin I.B., Samuel W. et al. Volatile evolution of long non-coding RNA repertoire in retinal pigment epithelium: insights from comparison of bovine and human RNA expression profiles // *Genes (Basel).* 2019. V. 3. P. 205.
- Resch A.M., Carmel L., Marino-Ramírez L. et al. Widespread positive selection in synonymous sites of mammalian genes // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1821–1831.
- Robinson R. Dark matter transcripts: sound and fury signifying nothing? // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. P. e1000370.
- Schüler A., Ghanbarian A.T., Hurst L.D. Purifying selection on splice-related motifs, not expression level nor RNA folding explains nearly all constraint on human lincRNAs // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 31. P. 3164–3183.
- Siepel A., Bejerano G., Pedersen J.S. et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes // *Gen. Res.* 2005. V. 15. P. 1034–1050.
- van Bakel H., Hughes T.R. Establishing legitimacy and function in the new transcriptome // *Brief. Funct. Gen. Proteom.* 2009. V. 8. P. 424–436.
- Vance K.W., Ponting C.P. Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs // *Trends in Genetics.* 2014. V. 30. P. 348–355.
- Zeng J., Nagrajan H.K., Yi S.V. Fundamental diversity of human CpG islands at multiple biological levels // *Epi-genetics.* 2014. V. 9. P. 483–491.
- Zou L.S., Erdos M. R., Taylor D.L. et al. BoostMe accurately predicts DNA methylation values in whole-genome bisulfite sequencing of multiple human tissues // *BMC Genom.* 2018. V. 19. P. 390.

Association between the lncRNA Conservation and CPG Islands Persistence

I. A. Sidorenko^a, I. B. Rogozin^{a, b}, and V. N. Babenko^{a, c, *}

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^b*National Institutes of Health, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA*

^c*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

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

Genes for long non-coding RNAs (lncRNAs) are present in large numbers in mammals, but their functions remain largely unknown. One possible way to study them is to use large-scale comparisons of various characteristics of lncRNA with the characteristics of protein-coding genes, for which there is a lot of functional information. A characteristic feature of protein-coding genes in mammals is the high evolutionary conservation: of the primary exon sequences. Although the conservation: of the primary lncRNA exon sequences is not as pronounced as that of the protein-coding genes, it is nevertheless significantly higher than that of the introns of the lncRNA genes. We assessed the conservation of above-mentioned traits with multiple alignment of mammals that are human, chimpanzee, mouse and rat. The conservation rate has been assessed by gene segments e.g. within exons, introns, and promoter segments (300bp upstream of transcription start site). A study of the relationship between lncRNA gene conservation rate, and the presence/absence of CpG islands (CGI) revealed a higher conservation of lncRNA genes, which are located next to CGI. This trend may be the cause of the previously identified association between conservative and lncRNA expression levels. A separate task was annotating the types of lncRNA within the samples (sense-, antisense-, intergenic lncRNA and pseudogenes). Based on the annotation it was established, that sense-lncRNAs (residing preferentially in the coding loci) maintain the highest ratio of promoter CGI. The next highest type was pseudogene, and then goes antisense — type lncRNA (AS-lncRNA). The least CGI enriched lncRNAs are intergenic RNAs. That implies that CGI-containing promoter is the feature more inherent to coding gene loci. Overall conservation rate of promoter CGI across all lncRNA classes was 45%. The study underlines the coding gene specific signals in non-coding RNA. Herein we extended the (coding) gene specific signals by promoter CGI analysis for the first time as far as we know.

Keywords: non-coding RNA, evolution, CpG islands, exons, introns, conservation rate

УДК 612

ПОРАЖЕНИЕ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ КАК ВЕДУЩИЙ МЕХАНИЗМ СИСТЕМНОЙ ПАТОЛОГИИ COVID-19

© 2021 г. О. А. Гомазков*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

*e-mail: oleg-gomazkov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.11.2020 г.

После доработки 17.11.2020 г.

Принята к публикации 17.11.2020 г.

Представлен анализ молекулярных и патофизиологических механизмов COVID-19. В качестве мишени агрессивного воздействия коронавируса SARS-CoV-2 рассматривается эндотелий кровеносных сосудов — своеобразное “эндокринное дерево” легких и других органов, где сосредоточены важные физиологические процессы. Поскольку главной клеточной мишенью “рецепции” вируса оказывается фермент АПФ2, рассмотрение его роли становится основной линией изложения. Коронавирус блокирует активность АПФ2, как естественного генератора ангиотензиновых пептидов, нарушая баланс гемоваскулярного контроля. В нормальных условиях эту миссию выполняет комплекс АПФ/АПФ2 — ферментов, контролирующих синтез и физиологическую активность ангиотензиновых и кининовых пептидов в организме. Изменения соотношений ангиотензин-брадикининовой оси и цитокиновый стресс ассоциируются с дисфункцией эндотелия и множественными сосудистыми нарушениями. Впервые предложено понятие “ШТОРМ-2”, когда причиной тяжелой полиорганной патологии оказываются нарушения гемостаза, трансцеллюлярной диффузии, поддержания артериального давления.

Ключевые слова: пандемия COVID-19, цитокиновый стресс, сосудистый эндотелий, ангиотензин-превращающий фермент 2, ангиотензин-брадикининовая ось, ШТОРМ-2, органные поражения

DOI: 10.31857/S0042132421020058

ВВЕДЕНИЕ

В связи с чрезвычайно быстрым развитием событий, связанных с пандемией COVID-19, важной задачей является анализ патофизиологических и молекулярных аспектов заболевания, определяющих сложный комплекс негативных процессов.

Вспышка данной инфекции вызвана вариантом коронавируса группы SARS-CoV. Всемирная организация здравоохранения определила официальное название инфекции COVID-19 (Coronavirus disease 2019). Международный комитет по таксономии вирусов присвоил новому возбудителю официальное название SARS-CoV-2.

Наиболее характерное проявление патогенеза COVID-19 — острое повреждение легких с инвертированной реакцией иммунных систем. Вызываемый исходно вирусной атакой цитокиновый шторм демонстрирует клиническую картину провоспалительной этиологии с проявлениями гемодинамической нестабильности, дисфункции многих органов тела, неврологического диссонанса. Системные сосудистые поражения, в первую очередь легких, но также сердца, мозга,

почек, эндокринных органов, кишечника и др., оказываются выраженными при различных формах этого заболевания.

Основной клеточной мишенью агрессии вируса служит ангиотензин-превращающий фермент второго типа (АПФ2, angiotensin-converting enzyme 2) — естественный биохимический фактор сосудистой регуляции. За счет очень высокого аффинитета коронавирус SARS-CoV-2 блокирует активность АПФ2, нарушая баланс цитоиммунного и гемоваскулярного контроля. В нормальных условиях эту миссию осуществляет комплекс родственных ферментов — АПФ и АПФ2, контролирующих синтез и физиологическую активность брадикинина и ангиотензинов. Специфическая акцепция коронавирусом фермента АПФ2 и, как следствие, превалирование его антипода АПФ выявляет диссонанс регуляции с дисфункцией клеток эндотелия и множественными нарушениями в системе гемостаза.

Второй аспект проблемы относится к роли эндотелия, монослоя клеток, выстилающих сосудистую поверхность. Поскольку основным местом локализации ферментов АПФ и АПФ2 в организме служит сосудистый эндотелий, поражение

клеток легких и других органов составляет типичную картину системной патологии COVID-19. Нарушение эндотелия оказывается ключевым процессом в “разладе” управления гомеостазом, тонусом сосудов, трансцеллюлярной диффузии, микроциркуляции, поддержания артериального давления. Дисбаланс биохимической оси АПФ/АПФ2 за счет усиления разрушительной активности ангиотензиновых пептидов ведет к пролонгации эффектов цитовоспаления, тромбогенеза, прогипертензивной активности.

На этом основании с учетом клинических материалов COVID-19, данных публикаций последнего периода предлагается термин ШТОРМ-2. Сущность его относится к манифестации множественных расстройств, когда клеточное воспаление сопровождается микротромбозами и геморагией с явлениями внутрисосудистого свертывания крови и полиорганной дисфункции. Эта негативная картина характерна не только для поражения легких, где воздействие коронавируса оказывается первичным. При остром течении заболевания зафиксированы нарушения функций сердца, мозга, почек, эндокринной системы и др., выраженные в форме коагулопатии, диссеминированных микротромбозов.

Понятие ШТОРМ-2 подразумевает возможность применения особой стратегии фармакотерапии COVID-19, ключевой составляющей которой служит нормализация эндотелия и управления свертывающей системой крови, трансцеллюлярной диффузии, поддержания артериального давления с воздействием на соответствующие фармакологические мишени.

ПАНДЕМИЯ COVID-19: ДИССОНАНС ПАТОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Сложность и многообразие проявлений коронавирусной болезни позволяет говорить о комплексе диссонансов патохимических процессов в организме.

Клинические исследования установили, что COVID-19 может протекать бессимптомно, либо иметь средние или тяжелые проявления, такие как: пневмония, дыхательная недостаточность, органная коагулопатия, неврологические расстройства. Показательны результаты рентгенографической и компьютерной томографии легких, когда при тяжелом течении болезни уже на ранних стадиях выявляются множественные очаговые изменения в сосудах.

Начальным этапом заражения служит проникновение коронавируса SARS-CoV-2 в клетки, содержащие мембраносвязанный белок АПФ2. Первичной, быстро достижимой мишенью оказываются альвеолярные клетки легких, что определяет развитие пневмонии. Иммунологические

осложнения — активация макрофагов, приводящая к синдрому цитокинового шторма и острому респираторному дистресс-синдрому, являются типичными для пациентов COVID-19. Провоцирующие воспаление цитокины, включая фактор некроза опухоли TNF, интерферон- γ , интерлейкины IL-1, IL-6, IL-18 и др., секретируются в большом количестве.

Наиболее распространенным клиническим проявлением COVID-19 является двусторонняя пневмония — диффузное альвеолярное повреждение с выраженной микроангиопатией. У части больных развивается гиперкоагуляционный синдром, поражаются также другие органы и системы: сердце, мозг, почки, печень, желудочно-кишечный тракт, эндокринная и иммунная системы. У пациентов с выраженным течением COVID-19 развивается васкулярная эндотелиальная дисфункция, сопровождаемая внутриклеточной диффузией, коагулопатией и тромбозами (Tang et al., 2020).

Таким образом, клиническое развитие COVID-19 включает несколько фаз:

- а) вирусную инфекцию и комплекс ответных гипериммунных, провоспалительных реакций в форме цитокинового шторма;
- б) нарушение эндотелия сосудов легочной, коронарной, церебральной и других систем;
- в) коагуляционные, тромботические осложнения в органной и диссеминированной формах;
- г) неврологические расстройства непосредственного и отдаленного характера.

В соответствии с этим, терапия различных форм COVID-19 использует соответствующие средства сдерживания диссонанса и поддержания защитной тактики лечения.

АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ — СИСТЕМА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ, ПРИЧАСТНЫХ К ПАТОГЕНЕЗУ

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) традиционно рассматривается как ведущий фактор ренин-ангиотензиновой системы, сопряженной с контролем заболеваний сердца и сосудов. К открытию этого фермента, исходно названного карбоксикапепсином, оказывается причастным Институт биологической и медицинской химии РАМН в Москве, когда в лаборатории академика В.Н. Ореховича среди ряда протеолитических белков была впервые выделена каталитическая единица со свойствами дипептидилкарбоксипептидазы и внесена в мировую номенклатуру ферментов как КФ 3.4.15.1. (Елисеева, Орехович, 1963). Наряду с этим, в этот список попадает исследованный Скегсом с соавт. гипертензин-конвертирующий энзим, получивший большую по-

пулярность как один из значимых регуляторов в кардиологии (Skeggs et al., 1956).

Роль ангиотензин-конвертазы, как специфической пептид-гидролазы, становится системной, когда было установлено, что она одновременно участвует в образовании прогипертензивного пептида ангиотензина II (АНГ-1-8) и в гидролизе его физиологического антипода — брадикинина, продукта калликреин-кининовой системы (Vane, 1969). Существенно для последующего изложения отметить, что иммунохимические исследования выявляли преобладающую локализацию АПФ на люминальной поверхности эндотелиальных клеток легких (Ryan et al., 1975). Медицинский аспект исследования АПФ подтверждается открытием сопряженных факторов регуляции крови и сосудистой системы (оксида азота, простагландинов, эндотелинов, простациклинов и др.), составляющих ныне комплексную систему тканевых биохимических процессов в норме и при различных заболеваниях.

Рассмотрение АПФ как кининазы II невозможно без его функционального “противника” — фермента калликреина, представителя калликреин-кининовой системы, также участвующей в контроле артериального давления. Последующие работы позволили говорить о целостной оси биохимических компонентов: АПФ → ангиотензин II → рецепторы → физиологические эффекты и, как противовес: фактор Хагемана → калликреин → кининоген → брадикинин, участвующие во множестве нормальных и патологических процессов в организме. В первую очередь, следует отметить связь этих систем с эндотелием легких в контроле гемоваскулярного равновесия (Гомазков, Комиссарова, 1976).

В 2000 году был открыт ангиотензин-превращающий фермент 2-го типа (АПФ2) (Donoghue et al., 2000; Tirnisi et al., 2000). Было установлено, что каталитические домены АПФ2 и АПФ сходны и участвуют в процессинге различных, физиологически значимых фрагментов крупного полипептида ангиотензиногена или в гидролизе брадикинина. Однако, АПФ2 не может, в отличие от АПФ, гидролизовать брадикинин или нейротензин. Существенно также, что АПФ2 не ингибируется лизиноприлом или каптоприлом.

В представлении о новой форме — АПФ2, возникал пророческий вопрос: What’s new in the renin-angiotensin system? (Что нового в ренин-ангиотензиновой системе?) (Warner et al., 2004). История, действительно, делает резкий драматический поворот: нынешние исследования устанавливают роль АПФ2 в качестве одной из основных причин тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2.

Принципиальным положением, которое определяет специфичность и масштабность инфек-

ции COVID-19, оказывается совпадение химических структур, благодаря которому коронавирус SARS-CoV-2 обладает исключительной способностью связываться с АПФ2 в клетках “хозяина”. Уровень связывания SARS-CoV-2 с АПФ2 в 10–20 раз выше, чем аффинность в отношении АПФ2 предыдущего вирусного штамма — SARS-CoV. На этих основаниях АПФ2 был представлен как функциональный рецептор SARS-CoV-2 (Li et al., 2003). Новый вирус, благодаря особой структуре шипов, использует АПФ2 в качестве “тройного коня” для входа в клетку-хозяина. Это обстоятельство, с одной стороны, выделяет начальные этапы сложного заболевания, а с другой — определяет целевую направленность разработки специфических белков (вакцин) в качестве блокаторов вирусов (Tai et al., 2020).

АПФ2 поражается во многих органах человека, но альвеолярные эпителиальные клетки легких оказываются первичной мишенью SARS-CoV-2 (Zou et al., 2020). Патохимический анализ установил также локализацию АПФ2 у человека в эндотелии артериальных и венозных сосудов и в артериях гладких мышц практически всех органов. Связанные с вирусной “рецепцией” молекулы АПФ2 были обнаружены в слизистой оболочке носа, рта, желудка, кишечника и др. как первая ступень вирусной инвазии (Hamming et al., 2004). Эта информация о полиорганном распространении АПФ2 свидетельствует о возможности большого распространения инфекции и разнообразных манифестаций патологии COVID-19.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОСЬ АПФ2/АПФ И МЕХАНИЗМ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА

Присоединение гликопротеинового шипа SARS-CoV-2 к АПФ2 запускает процессы, которые приводят к гипервоспалению. Рассматриваются несколько молекулярных линий гиперпродукции воспалительных цитокинов и инициации цитокинового шторма.

Наряду с данными иммунохимического анализа, значимой оказывается идея, связанная с ролью самого АПФ2, основной “мишени” агрессии коронавируса. Особая роль АПФ и АПФ2 состоит в способности влиять на образование различных фрагментов ангиотензина I (АНГ1-10). Исходно функционально ось: АПФ2 → АНГ(1–7) → рецептор MasR противостоит оси: АПФ → АНГ(1–8) → рецептор AT1R. Подавление коронавирусом рецептора АПФ2 ведет к нарушению соотношения, провоцирующего экспрессию провоспалительных факторов (рис. 1).

Новые данные свидетельствуют об особенной роли АНГ(1–7) и брадикинина как инициаторов провоспалительных реакций (Mahmoudpour et al., 2020). Важной защитной функцией мембрано-

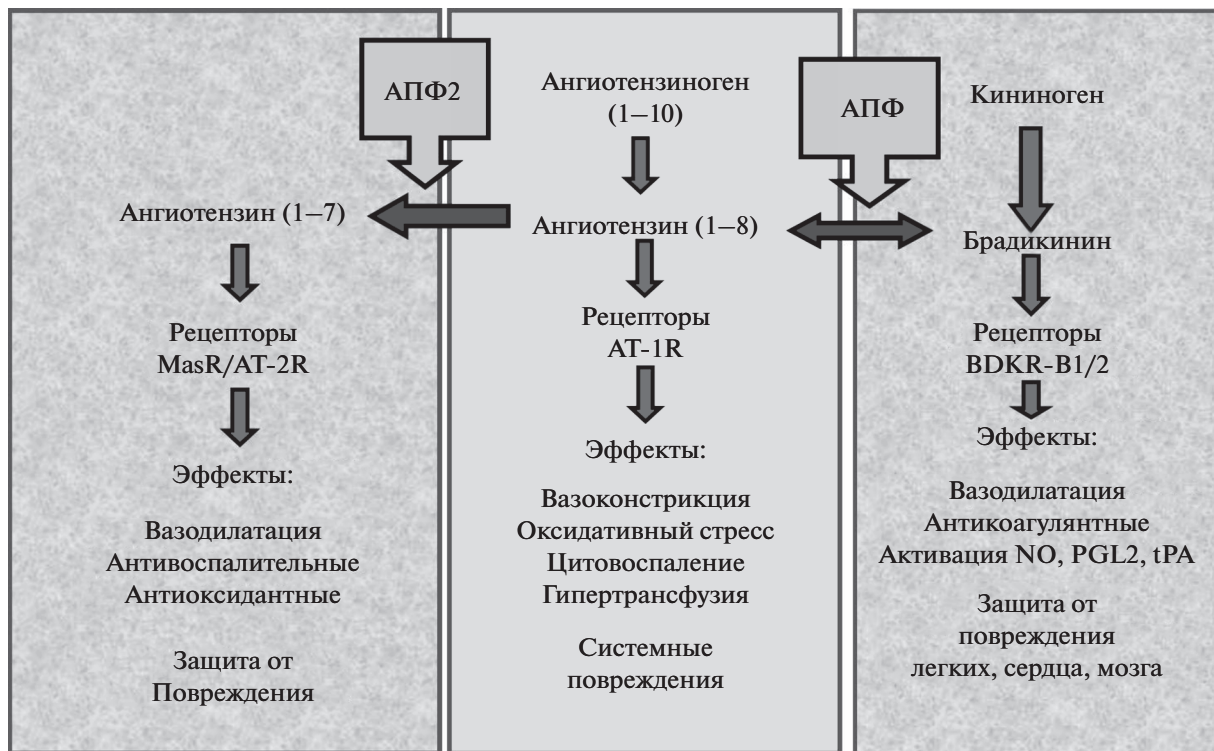


Рис. 1. Соотношение биохимических осей АПФ и АПФ2 и дисбаланс АНГ(1–7), АНГ(1–8) и брадикинина. Функциональное противостояние и взаимодействия пептидов с рецепторами определяют протективные или патогенетические эффекты. Агрессивное взаимодействие коронавируса с ферментом АПФ2 нивелирует его защитную миссию, снижает за счет АПФ активность брадикинина и стимулирует гиперпродукцию АНГ(1–8), вызывая множественные нарушения васкулярного гомеостаза.

связанного АПФ2 служит образование АНГ(1–7). Исходно АНГ(1–7) обладает противовоспалительной активностью за счет экспрессии сигнальных трансдукторных и транскрипционных белков NF-κB, MAPK и ERK 1/2. Эффекты АНГ(1–7) реализуются при взаимодействии с рецепторами MasR в эпителии легких и гладких мышцах бронхов, противодействуя развитию воспалительных процессов (Santos et al., 2018).

Однако подавление коронавирусом фермента АПФ2 может сопровождаться нивелированием этих функций. Снижение образования пептида АНГ(1–7) приводит к стимулированию цитокинов и развитию воспалительных ответов (Ghebblawi et al., 2020).

История противостояний имеет продолжение при рассмотрении компонентов калликреин-кининовой системы. Диссонанс, вызываемый при блокировании коронавирусом АПФ2, выводит на первый план повышение экспрессии АПФ, в данном случае — кининазы II. В результате отмечается снижение позитивных клеточных эффектов брадикинина и, напротив, повышение уровня [des-Arg9] брадикинина, известного как провоспалительный агент легочного эпителия. Результатом кининовой цитотоксичности становится масси-

рованная активность нейтрофилов и усиление негативных явлений, ассоциируемых с тяжелой формой COVID-19 (van de Veerdonk et al., 2020). Кининовый рецептор BKB1R, будучи активированным цитокинами типа IL-1β и TNF-α, оказывается одним из компонентов провоспалительного клеточного процесса. Имеются данные, что применение блокатора рецептора может быть использовано для терапии острого респираторного дистресс-синдрома (Barth et al., 2012; Qadri, Bader, 2018).

СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИЙ – МИШЕНЬ СИСТЕМНОГО ПОРАЖЕНИЯ

Эндотелий как эндокринное дерево, или “маэстро кровообращения”

В 1970–1980-х гг. минувшего столетия популярной была концепция метаболической, или биотрансформирующей функции легких, где на переходе от венозной к артериальной крови происходит активный синтез или деградация важнейших биохимических субстанций. Согласно материалам того времени, биотрансформации подвергаются гуморальные медиаторы: адреналин, оксид азота, полипептиды ангиотензины I

и II, брадикинин, эндотелин, простагландины E1 и E2, циклические нуклеотиды цАМФ и цГМФ, простациклины и др. Легкие выполняют роль функционального фильтра, который определяет количественный и качественный, а по сути, регулирующий состав биохимических компонентов всей системы гемодинамики (Дубилей и др., 1987).

Второй аспект этой концепции относился к выделению роли эндотелия как “эндокринного дерева”, или “маэстро кровообращения”, по характеристике Нобелевского лауреата Дж. Вейна (Vane, 2001). По нынешним представлениям эндотелий не только регулирует эндотелий-зависимую вазодилатацию, но также активно подавляет тромбоз, сосудистое воспаление и гипертрофию. Здоровый эндотелий проявляет вазодилататорный фенотип за счет высокой активности факторов релаксации — оксида азота (NO) и простациклина (PGI₂), низкого уровня реактивных форм кислорода (ROS) и мочевой кислоты. Антикоагулянтная активность включает низкие уровни ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), фактора свертывания крови фон Виллебранда (vWF) и P-селектина. В качестве регуляторов клеточного воспаления клетки эндотелия секретируют молекулы адгезии сосудистых клеток (sVCAM), межклеточной адгезии (sICAM), E-селектина, C-реактивного белка, TNF- α и IL-6.

При дисфункции эндотелия в ответ на экспрессию провоспалительных цитокинов эндотелиальные клетки секретируют факторы TNF- α и PAF, которые стимулирует агрегацию тромбоцитов и адгезию нейтрофилов. Также активируются многочисленные провоспалительные продукты, включая цитокины (IL-1, TNF- α), хемокины (IL-8, MCP-1) и молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin), которые служат сигналами для рекрутирования лейкоцитов к участкам повреждения. Нарушения эндотелия, затрагивающие гемодинамику в целом или отдельных органов, оказываются причиной многих заболеваний (Гомазков, 2000; Rajendran et al., 2013).

В третьем аспекте концепции рассматриваются сопряженные с эндотелием регуляторы тромбогенеза и тонуса сосудистой стенки. Поскольку ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) находит свое “пристанище” в эндотелиальных caveолах, была описана связка ренин-ангиотензиновой (ангиотензины I и II) и калликреин-кининовой (брадикинин, “система фактора Хагемана”) компонентов гемоваскулярного гомеостаза — подвижного соотношения реологической компоненты, тонуса сосудистой стенки и влияния ингибиторов ферментов (Гомазков, Трапезникова, 1978; Kalinina et al., 1997).

Эндотелиальная дисфункция как продолжение цитокинового шторма

Симптомы, которые манифестируются при инфекции COVID-19: высокое артериальное давление, тромбоэмболия, заболевания почек, неврологические расстройства, диабет — указывают на то, что вирус использует в качестве мишени эндотелий, одну из важнейших тканевых систем организма. В статье Сарду с соавт., посвященной анализу множественных органических нарушений, ставится ключевой вопрос: “Is Covid-19 an endothelial disease? (Является ли Covid-19 эндотелиальным заболеванием?)” (Sardu et al., 2020). Можно определить в качестве исходной позиции, что вирусная атака SARS-CoV-2 провоцирует гиперактивацию цитокинов и хемокинов. Отмечается определенная последовательность иммунной защиты, которая, впрочем, приобретает форму стохастического возмущения, когда протективная миссия совмещается с избыточной экспрессией и уничтожением самих ликвидаторов (Shimabukuro-Vornhagen et al., 2018; Ye et al., 2020).

Следствием быстрой репликации вируса и провоспалительного ответа цитокинов становится стимулирование апоптоза с повреждением микрососудов и клеточных барьеров с развитием альвеолярного отека и легочной и системной гипоксией. Таким образом, индуцирующие друг друга цепочки иммунных реакций, нарушающие последовательность и адекватность процессов, играют первичную роль в патогенезе острого респираторного синдрома COVID-19 (Merad, Martin, 2020; McGonagle et al., 2020).

Патогенез вступает в критическую фазу, когда развиваются расстройства, связанные с нарушениями сосудистого эндотелия. Активация эндотелия происходит первоначально в рамках микроциркуляции, включая микротромбы и капиллярные кровоизлияния. Клинические данные свидетельствуют, что вызванная цитокинами дисфункция, особенно на второй стадии заболевания, имеет полиорганное продолжение: артериальная гипертензия, поражения миокарда, диабет, неврологические осложнения, которые отвечают принципу генерализованного расстройства (Pearce et al., 2020). Нарушение антитромботической эндотелиальной поверхности, наряду с ослаблением фибринолиза, влияет на развитие общего и диссеминированного тромбогенеза (Marchandot et al., 2020). Клинические маркеры, такие как D-димер, продукт деградации фибрина, предсказывают негативный характер патологии, отражая диссонанс биохимических каскадов и стимулирование коагулопатии.

СЕМЕЙСТВО АНГИОТЕНЗИНОВ И БРАДИКИНИН. НАРУШЕНИЕ РАВНОВЕСИЯ КАК ПРИЧИНА ПОЛИОРГАННОЙ ПАТОЛОГИИ COVID-19

При рассмотрении патобиохимических механизмов COVID-19 особое внимание привлекает диссонанс биохимических осей регуляции гемоваскулярного гомеостаза. В нормальных условиях равновесие (точнее, функциональный гомеостаз) осуществляется в рамках противостояния АПФ → АНГ(1–8) → рецептор AT1R//АПФ2 → → АНГ(1–7) → рецептор MasR. Принято считать, что АНГ(1–8), продукт гидролиза АПФ, является одним из основных факторов, вызывающих эндотелиальную дисфункцию. Тому подтверждение – комплекс реакций, ведущих к повреждению: окислительный стресс, провоспалительная и протромботическая активность, вазоконстрикция, изменение проницаемости сосудов (Williams et al., 1995; Victorino et al., 2002). Для АНГ (1–8) характерны также долговременные эффекты, включающие гипертрофию миокарда, вазкулярное ремоделирование, почечный фиброз.

В отличие от первого фермента – АПФ – биохимическая ось АПФ2 → АНГ(1–7) → Mas1R служит защите в форме противовоспалительного и антитромботического механизмов. Позитивная роль АНГ(1–7) реализуется через Mas-рецепторы пластинок, активация которых увеличивает выработку NO и усиливает антиагрегационные свойства. Ориентация на рецепторы сосудистого эндотелия и факторы крови в противостоянии систем ангиотензинов и кининов служит поддержанию гемоваскулярного баланса и снижению рисков сосудистых эксцессов (Fang, Schmaier, 2020).

Агрессивное подавление коронавирусом АПФ2 меняет картину противостояния АПФ/АПФ2 в сторону превалирования эффектов АНГ(1–8) и потенцирования патогенеза. Таким образом, интрига, связанная с COVID-19, заключается в нивелировании роли АПФ2 и усилении негативной активности продуктов АПФ. Существенно в этом плане, что уровень АНГ(1–8), продукта, “раскрепощенного” АПФ, был заметно повышен в крови больных COVID-19 и линейно связан со степенью повреждения легких (Liu et al., 2020). Такой вывод имеет значение для понимания стратегии использования средств лечения COVID-19. Современная фармакология располагает комплексом веществ-блокаторов соответствующих рецепторов брадикинина и ангиотензинов.

Вердечия с соавт. (Verdecchia et al., 2020) считают, что подавление АПФ2, вызванное вирусной инфекцией, может быть особенно неблагоприятным у пациентов с исходным (возрастным) дефицитом АПФ2, усиливая нарушение регуляции между негативной осью АПФ → АНГ(1–8) → ре-

цептор AT1R/2R и условно протективной АПФ2 → → АНГ(1–7) → рецептор MasR. Изменения будут способствовать прогрессированию воспалительных и тромботических процессов, вызванных местной гиперактивностью АНГ(1–8), которому не противостоит АНГ(1–7). В качестве дополнительного аргумента приводятся клинические наблюдения, указывающие, что ингибиторы АПФ или антагонисты ВК-рецепторов, используемые обычно для терапии и профилактики гипертонии, ассоциируются теперь с пониженной тяжестью заболевания и тенденцией к низким уровням IL-6 с увеличенным количеством циркулирующих иммунных CD3/CD4/T-клеток (Xiao et al., 2020).

Третьим компонентом регуляции биохимических осей АПФ/АПФ2 оказывается брадикинин как фактор гуморальной калликреин-кининовой системы с вовлечением в эту схему фактора Хагемана. АПФ, как “ключ на два поворота”, не только участвует в образовании прогипертензивного АНГ(1–8), но также, как кининаза II, гидролизует брадикинин и ограничивает его функции (Гомазков, Комиссарова, 1976). Физиологические эффекты кининов опосредуются через рецепторы BK1R и BK2R в эндотелии сосудов и гладкомышечных клетках. Новые данные свидетельствуют, что брадикинин, взаимодействуя с этими рецепторами, влияет на проницаемость сосудов и клеточное воспаление, провоцируя экспрессию цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 и TNF-α. Также было установлено, что брадикинин стимулировал в альвеолярных клетках высвобождение провоспалительных цитокинов – нейтрофилов и хемотаксических моноцитов (Koyama et al., 1998).

Предыдущие работы добавляют факты, свидетельствующие о роли калликреин-кининовой системы в патогенезе легочной инфекции. У пациентов с острым респираторным дистрессом в бронхоальвеолярном лаваже повышено содержание активированного фактора Хагемана (XIIa), прекалликреина и высокомолекулярного кининогена (McGuire et al., 1982). В контексте анализа патогенеза COVID-19 было высказано предположение, что ангионевротический отек легких при инфекции связан с активацией кининовых рецепторов B1R и B2R. При фармакологической оценке блокирование рецепторов B2R и ингибирование активности калликреина могут иметь смягчающий эффект в ранний период заболевания COVID-19 и влиять на развитие острого респираторного синдрома (van de Veerdonk et al., 2020; Kreutz et al., 2020). Таким образом, дисрегуляция, вызываемая высокой активностью кининов, присутствует уже на ранних стадиях вирусной атаки при патологии COVID-19. Блокада коронавирусом фермента ACE2 становится прецедентом, стимулирующим механизм повреждающего действия брадикинина.

ШТОРМ-2 КАК ВТОРАЯ СТАДИЯ ПАТОГЕНЕЗА COVID-19

Наряду с первичной драматической атакой вируса на систему легких наиболее вероятным сценарием патогенеза COVID-19 оказывается повреждение эндотелиальных клеток легких и других органов. Вызываемый коронавирусом цитокиновый шторм рассматривается как особый клинический синдром деструктивной провоспалительной этиологии с проявлениями гемодинамической нестабильности, полиорганной дисфункции, неврологического диссонанса. Нарушенное взаимодействие между эндотелиальными и иммунными клетками может играть основную роль как в начальные периоды заболевания, особенно в тяжелых случаях, так и на поздних стадиях.

На этом фоне значимым видится механизм разрушительной роли коронавируса, который использует в качестве мишени АПФ2 и нивелирует нормальный функциональный баланс систем оси АПФ/АПФ2. Блокада АПФ2 и изменение соотношения в ангиотензин-брадикининовой связке служит объяснением поражений многих органов.

Суммируя данные клинических и экспериментальных исследований, можно выделить несколько позиций.

- Особенностью патологии COVID-19, в отличие от предыдущих форм острых респираторных поражений, оказывается генерализованное расстройство гемоваскулярного контроля. Сосудистый механизм поражения включает дисбаланс с превалированием воспалительных, оксидативных, вазоконстрикторных реакций. Эти процессы ведут к изменению проницаемости, тонуса сосудов и соотношения тромбоцитарной и плазминовой систем крови. Комплекс этих реакций оказывается причиной поражения многих органов.

- Основным в рассмотрении патогенеза COVID-19 оказывается расстройство биохимической оси ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем. Дисбаланс за счет усиления активности АПФ при нивелировании АПФ2 ведет к ограничению активности брадикинина и усиления АНГ(1–8) как факторов провоспаления, тромбогенеза и прогипертензивной активности.

- На основе анализа биохимических механизмов предлагается понятие “ШТОРМ-2”, ключевой составляющей которого служат дисфункция эндотелия и “разлад” управления свертывающей системой крови, тонусом сосудов, трансцеллюлярной диффузии, поддержания артериального давления. Как показывает клинический анализ, у пациентов с острым течением COVID-19 развивается васкулярная эндотелиальная дисфункция сердца, мозга, почек, эндокринной системы и др., коагулопатия, тромбозы с клинической карти-

ной, напоминающей антифосфолипидный катастрофический синдром. Этот процесс типичен в первую очередь для легких, но также относится к поражению многих систем: миокарда, почек, головного мозга, гастроинтестинальной системы, эндокринных органов и др. Существенно, что осложнения сопряжены с наличием в анамнезе пациента других форм патологии. Особое значение имеет непосредственное и “отложенное” нарушение функций мозга, включая психосоциальный аспект, захватывающий практически весь современный мир (Инструктивное письмо Минздрава РФ, 2020). С учетом предложенного термина “ШТОРМ-2” эти клинические выводы подтверждаются иллюстрацией механизмов диссонанса АПФ/АПФ2, которые подразумевают возможность применения избирательной стратегии терапии COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задача данной статьи заключалась в систематизации информации, полученной в последние несколько месяцев борьбы с пандемией COVID-19. Рассмотрение публикаций по COVID-19 и опыт работы автора в молекулярной патофизиологии позволили определить основные линии изложения.

Вirus SARS-CoV-2 запускает цитокиновый шторм и дисфункцию эндотелия. В результате организованная физиологическая система превращается в механизм полифункционального “раздрая” и развития заболевания. Поскольку основной целью фиксации патогенного вируса SARS-CoV-2 оказывается фермент АПФ2, представитель ключевого контроля гемоваскулярной системы, рассмотрение его роли при “рейдерской рецепции” становится ведущей линией изложения.

Сущность патогенетического действия коронавируса состоит в массивной атаке на АПФ2 и разрушении физиологического равновесия комплекса АПФ/АПФ2. Поскольку оба фермента относятся к протеиназам, локализованным преимущественно в клетках эндотелия, этот тканевой “плацдарм” оказывается местом патологического диссонанса систем крови и кровеносных сосудов. Появление вируса SARS-CoV-2 с избирательным поражением АПФ2 фатально влияет на картину функционального дисбаланса. Интрига, связанная с патогенезом коронавируса SARS-CoV-2, заключается в нивелировании АПФ2 и усилении разрушительной активности АПФ. Функциональный дисбаланс АПФ/АПФ2 ведет к усилению роли кининов и ангиотензина II как факторов воспаления, инициации цитокинов, усиления тромбогенеза, прогипертензивной активности.

Анализ материалов, акцентирующих изменения биохимической оси ангиотензиновых и кининовых полипептидов, основных регуляторов состояния крови и тонуса сосудов, служит основанием для понятия “ШТОРМ-2”. Комплекс патохимических процессов разворачивается на площади эндотелия, где во второй фазе вирусной инфекции развиваются полиорганная коагулопатия и нарушения макро- и микрогемодинамики с множественными чертами поражения. Эта негативная картина характерна не только для поражения легких, где воздействие коронавируса оказывается первичным, но также и для сердца, почек, эндокринных органов, мозга и других систем организма.

Понятие “ШТОРМ-2” подразумевает необходимость применения особой стратегии фармакотерапии COVID-19, ключевой составляющей которой служит нормализация функции эндотелия и управления свертывающей системой крови, тонуса сосудов, трансцеллюлярной диффузии, артериального давления с воздействием на соответствующие фармакологические мишени.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор приносит благодарность кандидату биологических наук А.В. Рудик за поддержку и техническое сопровождение работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-60285.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гомазков О.А. Молекулярные и физиологические аспекты эндотелиальной дисфункции. Роль эндогенных химических регуляторов // Успехи физиол. наук. 2000. Т. 31 (4). С. 48–62.
- Гомазков О.А., Комиссарова Н.В. Общие механизмы биохимической регуляции калликреиновой, свертывающей и фибринолитической систем крови // Успехи соврем. биол. 1976. Т. 82 (6). С. 356–370.
- Гомазков О.А., Трапезникова С.С. Биохимическая и физиологическая характеристики кининазной и ангиотензин-превращающей функции легких // Успехи соврем. биол. 1978. Т. 86 (2). С. 259–268.
- Дубилей П.В., Уразаева З.В., Хамитов Х.С. Барьерная функция легких и обеспечение гомеостаза. Казань: КГУ, 1987. 192 с.
- Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н. Выделение и изучение специфичности карбоксикапепсина // ДАН СССР. 1963. Т. 153 (4). С. 954–956.
- Инструктивное письмо Минздрава РФ, версия 08 от 3 сентября 2020. Временные методические рекомендации: профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19.
- Barth M., Bondoux M., Luccarini J.-M. et al. From bradykinin B2 receptor antagonists to orally active and selective bradykinin B1 receptor antagonists // J. Med. Chem. 2012. V. 55 (6). P. 2574–2584.
- Donoghue M., Hsieh F., Baronas E. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin(1–9) // Circ. Res. 2000. V. 87. P. E1–E9.
<https://doi.org/10.1161/01.res.87.5.e1>
- Fang C., Schmaier A.H. Novel antithrombotic mechanisms mediated by Mas receptor as result of balanced activities between the kallikrein/kinin and the renin-angiotensin systems // Pharmacol. Res. 2020. V. 160. P. 105096.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105096>
- Gheblawi M., Wang K., Viveiros A. et al. Angiotensin converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system // Circ. Res. 2020. V. 126 (10). P. 1456–1474.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317015>
- Hamming I., Timens W., Bulthuis M. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis // J. Pathol. 2004. V. 203 P. 631–637.
- Kalinina E.V., Posdnev V.F., Komissarova N.V., Gomazkov O.A. Effect of new peptide inhibitors on the ratio of angiotensin-I converting and kinin-degrading activities (ACE) // Biochemistry (Moscow) 1997. V. 62 (3). P. 247–250.
- Koyama S., Sato E., Nomura H. et al. Bradykinin stimulates type II alveolar cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity and inflammatory cytokines // Am. J. Pathol. 1998. V. 153 (6). P. 1885–1893.
- Kreutz R., Algharably E., Ganten D. et al. Renin-angiotensin-system (RAS) and COVID-19 – on the prescription of RAS blockers // Dtsch. Med. Wochenschr. 2020. V. 145 (10). P. 682–686.
- Li W., Moore M., Vasilieva N. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus // Nature. 2003. V. 426. P. 450–454.
- Liu Y., Yang Y., Zhang C. et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. P. 364–374.
<https://doi.org/10.1007/s11427-020-1643-8>

- Mahmudpour M., Roozbeh J., Keshavarz M. et al.* COVID-19 cytokine storm: the anger of inflammation // *Cytokine*. 2020. V. 133. P. 155151.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155151>
- Marchandot B., Sattler L., Jesel L. et al.* COVID-19 related coagulopathy: a distinct entity? // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9 (6). P. 1651.
<https://doi.org/10.3390/jcm9061651>
- Mcgonagle D., Sharif K., O'regan A. et al.* The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease // *Autoimmun. Rev.* 2020. V. 19 (6). P. 102537.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>
- McGuire W.W., Spragg R.G., Cohen A.B., Cochrane C.G.* Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome // *J. Clin. Invest.* 1982. V. 69 (3). P. 543–553.
<https://doi.org/10.1172/jci110480>
- Merad M., Martin J.C.* Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. V. 20 (6). P. 355–362.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
- Pearce L., Davidson S.M., Yellon D.M.* The cytokine storm of COVID-19: a spotlight on prevention and protection // *Exp. Opin. Ther. Targ.* 2020. V. 24 (8). P. 723–730.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1783243>
- Qadri F., Bader M.* Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation // *Expert Opin. Ther. Targets*. 2018. V. 22 (1). P. 31–44.
<https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1409724>
- Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J. et al.* The vascular endothelium and human diseases // *Int. J. Biol. Sci.* 2013. V. 9 (10). P. 1057–1069.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>
- Ryan J.W., Ryan U.S., Schultz D.R. et al.* Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II) // *Biochem. J.* 1975. V. 146 (2). P. 497–499.
<https://doi.org/10.1042/bj1460497>
- Sardu C., Gambardella J., Morelli M.B. et al.* Hypertension, thrombosis, kidney failure, and diabetes: is COVID-19 an endothelial disease? A comprehensive evaluation of clinical and basic evidence // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9 (5). P. 1417.
<https://doi.org/10.3390/jcm9051417>
- Shimabukuro-Vornhagen A., Gödel P., Subklewe M. et al.* Cytokine release syndrome // *J. Immunother. Cancer*. 2018. V. 6. P. 56.
<https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9>
- Skeggs I., Kahn J., Shumway N.P.* The preparation and function of the hypertensin converting enzyme // *J. Exp. Med.* 1956. V. 103 (3). P. 295–299.
<https://doi.org/10.1084/jem.103.3.295>
- Tai W., He L., Zhang X. et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine // *Cell Mol. Immunol.* 2020. V. 17. P. 613.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4>
- Santos R.A.S., Sampaio W.O., Alzamora A.C. et al.* The ACE2/angiotensin-(1–7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1–7) // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98 (1). P. 505–553.
- Tang N., Li D., Wang X., Sun Z.* Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18. P. 844–847.
- Tipnis S., Hooper N.M., Hyde R. et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 33238.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M002615200>
- Vane J.R.* The release and fate of vasoactive hormones in the circulation // *Brit. J. Pharmacol.* 1969. V. 35 (2). P. 209–242.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1969.tb07982.x>
- Vane J.R.* My life and times with enzymes and mediators // *Med. Sci. Monit.* 2001. V. 7. P. 790–800.
- van de Veerdonk F.L., Netea M.G., van Deuren M. et al.* Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome // *Elife*. 2020. V. 27. P. 9:e57555.
<https://doi.org/10.7554/eLife.57555>
- Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A. et al.* The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection // *Eur. J. Intern. Med.* 2020. V. 76. P. 14–20.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.04.037>
- Victorino GP, Newton CR, Curran B.* Effect of angiotensin II on microvascular permeability // *J. Surg. Res.* 2002. V. 104. P. 77–81.
<https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6412>
- Warner F.J., Smith A.I., Hooper N.M., Turner A.J.* What's new in the renin-angiotensin system? Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective // *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61 (21). P. 2704–2713.
- Williams B., Baker A.Q., Gallacher B. et al.* Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells // *Hypertension*. 1995. V. 25 (5). P. 913–917.
- Xiao G., Zhang J., He X. et al.* Renin-angiotensin system inhibitors improve the clinical outcomes of COVID-19 patients with hypertension // *Emerg. Microb. Infect.* 2020. V. 9 (1). P. 757–760.
- Ye Q., Wang B., Mao J.* The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 // *J. Infect.* 2020. V. 80 (6). P. 607–613.
- Zou X., Chen K., Zou J. et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection // *Front Med.* 2020. V. 14 (2). P. 185–192.
<https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>

Vascular Endothelium Damage as a Leading Mechanism of COVID-19 Systemic Pathology

O. A. Gomazkov*

Orekhovich Scientific Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

**e-mail: oleg-gomazkov@yandex.ru*

An analysis of the molecular and pathophysiological mechanisms of COVID-19 is presented. The endothelium of blood vessels, a kind of “endocrine tree” of the lungs and other organs, where important pathophysiological processes are concentrated, is considered as the target of the aggressive effects of the SARS-CoV-2 coronavirus. Since the main cellular target of viral aggression is the ACE2 enzyme, consideration of its role becomes the main line of discussion. Coronavirus blocks the activity of ACE2, as a natural producer of angiotensins peptides, disrupting the balance of hemovascular control. Under normal conditions this mission is performed by the ACE/ACE2 complex — enzymes that control the synthesis and physiological activity of angiotensins and bradykinin peptides. Changes in the ACE/ACE2 axis ratios and cytokine stress are associated with endothelial dysfunction and multiple vascular disorders. For the first time, the concept of “STORM-2” was proposed, when the cause of severe organs pathology is violations of hemostasis, transcellular diffusion, and maintenance of blood pressure.

Keywords: COVID-19 pandemic, cytokine stress, vascular endothelium, angiotensin-converting enzyme-2, angiotensin-bradykinin axis, STORM-2, organ damage

УДК 616.74-009.115

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ МИАСТЕНИИ У ГРЫЗУНОВ ПОСРЕДСТВОМ ИНДУКЦИИ АУТОИММУННОГО ПОРАЖЕНИЯ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ

© 2021 г. С. В. Чепур¹, М. А. Юдин¹, А. С. Никифоров¹, И. М. Иванов¹,
А. Н. Алексеев¹, Т. М. Устинова¹, *

¹Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 30.09.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Показана возможность моделирования миастении у крыс посредством внутривенного введения рекомбинантных плазмидных ДНК, кодирующих химерный Н-холинорецептор с помощью гидропояции. Формирование нарушений нервно-мышечной проводимости оценивали при электронейромиографии в виде снижения амплитуды М-ответа и его декремента, уменьшения площади ответа, а также снижение работоспособности по тестам “Плавание с грузом” и “Сила хвата”. В ходе гематологического исследования в динамике прослежено увеличение численности популяций лимфоцитов и моноцитов крови, увеличение содержания в ней антител к холинорецептору и провоспалительного цитокина IL-1 α . Разработанная модель может быть использована при отборе лекарственных средств для терапии миастении.

Ключевые слова: миастения, Н-холинорецептор, экспериментальная модель

DOI: 10.31857/S0042132421020034

ВВЕДЕНИЕ

Поиск средств и методов терапии миастении (myasthenia gravis — далее MG) определяет необходимость совершенствования ее экспериментальных моделей. MG относят к аутоиммунным заболеваниям с образованием афинных к α -цепи Н-холинорецептора (Н-ХР) антител (Behin, Le Panse, 2018). Повреждение ХР может протекать через усиление скорости их деградации и облегчение фагоцитоза макрофагами, через активацию системы комплемента и через блокаду связывания с ацетилхолином (Mantegazza et al., 2016).

Проявления MG у животных сопряжены с мышечной слабостью, обратимой после применения ингибиторов ацетилхолинэстеразы, декрементом М-ответа и нарушением функций аксонов периферических нервов. Для животных с MG характерна поза с опущенной вниз головой, подгибающимися передними конечностями и сильно выгнутой спиной, наблюдают рывки головой и передними конечностями, прослеживают недержание мочи и отсутствие глотательных движений (Gilhus et al., 2016). Тяжелые формы MG сопровождаются заболеваниями дыхательных путей, часто с гиперсекрецией и слезоточивостью. Шумное дыхание, обусловленное параличом гортани, пропа-

дает после восстановления мышечной силы (Rasca et al., 2020).

Экспериментальную MG на животных моделируют аутоантителами и лимфокинами, выделенными из крови и тимуса больных миастенией; десенсибилизацией ХР, выделенными из электрического органа *Torpedo californica* в полном адьюванте Фрейнда; введением пенициллина (Fuchs et al., 2014). При введении крысам антител к ХР в больших дозах выделяют два периода мышечной слабости, сопровождающихся потерей массы тела. Первый острый период протекает с 7 по 12 сут, а восстановление мышечной силы обычно наступает уже на 15 сут. Второй период с прогрессирующей мышечной слабостью возникает между 26 и 35 сут, причем ему предшествует появление заболеваний дыхательных путей (Baggi et al., 2012).

Существуют также неиммунные модели миастенических синдромов, которые связаны с мутациями генов, кодирующих различные эпитопы субъединиц ХР, а также модельные состояния, связанные с десенсибилизацией Н-ХР при промежуточном синдроме и при отдаленных демиелинизирующих нейропатиях после отравления фосфорорганическими соединениями (Тюнин и

др., 2017). МГ у животных моделируют также нокаутом генов белков, ответственных за формирование иммунного ответа (Cao et al., 2017).

Н-ХР выявлены и в иммунокомпетентных клетках, что также необходимо учитывать в патогенезе МГ. TCR/CD3-зависимый путь индуцирует экспрессию $\alpha 4$ - и $\alpha 7$ -субъединиц Н-ХР в CD4-позитивных Т-лимфоцитах мышей (Qian et al., 2011). В Т-клеточной линии CCRF-CEM лейкемии человека никотин ингибировал экспрессию мРНК всего спектра субъединиц Н-ХР и в присутствии внеклеточного Ca^{2+} запускал краткосрочное увеличение проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} . Этот эффект отменяли агонисты $\alpha 7$ -субъединицы Н-ХР (к примеру, α -бунгаротоксин), что подтверждает роль Н-ХР в Ca^{2+} -сигналинге Т-клеток (Wang et al., 2004).

В макрофагах, $\alpha 7$ -субъединицы Н-ХР играют роль негативных регуляторов синтеза и секреции TNF- α (Wang et al., 2003). Предполагают, что функция иммунных клеток частично регулируется холинергической системой посредством паракринных влияний по типу дистантного синапса через $\alpha 7$ -субъединицу Н-ХР (Fujii et al., 2007). $\alpha 7$ -Субъединица Н-ХР вовлечена в регуляцию продукции провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, модулируют продукцию антител.

Цель исследования состояла в испытании химерной конструкции типа экстраклеточного домена $\alpha 1$ -субъединицы Н-ХР быка *Bovis taurus*, слитого с N-конца с субъединицей A_1 энтеротоксина *Vibrio cholerae* O1 для моделирования МГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из питомника РАН “Рапполово”. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде в соответствии с правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и работе с животными, утвержденными ГОСТ Р 53434-2009.

Синтезировали рекомбинантную плазмидную ДНК (РПД ХР), кодирующую химерный ХР выбранной структуры (ООО “АТГ Сервис Ген”, г. Санкт-Петербург). Препарат представлял собой прозрачный раствор, который вводили в организм посредством метода гидропорации. Гидродинамическое воздействие представляло собой внутривенное (в/в) введение РПД в физиологическом растворе в течение 25–35 с из расчета 1 мг/кг в объеме, соответствующем 10% от массы тела. Экспериментальные животные получали РПД однократно и трехкратно (1 раз в день). Животным контрольной группы вводили РПД, ко-

дирующую целевой белок, без последовательности, аналогичным способом. Всем животным подкожно вводили полный адъювант Фрейнда в дозе 0.2 мг/кг для стимуляции выработки антител.

Появление в крови IgG к ХР и IL-1 α , отражающего воспалительную реакцию, оценивали количественно с применением соответствующих иммуноферментных тест-систем с помощью анализатора ChemWell Elisa 2910 (Awareness Technology, США). Формирование МГ у животных подтверждали в ходе электронейромиографии (ЭНМГ) и тестов “Плавание с грузом” (10% до отказа) и “Сила хвата”, определяли клеточный состав крови (динамика лейкоцитов и их популяций, IL-1 α и антитела к ХР). Мышечную утомляемость оценивали по времени плавания с отягощением (10% от массы тела) до отказа и в тесте, определяющем максимальную силу хватки лап (Grip Strength Meter, Columbus). Критерием мышечной утомляемости являлось статистически значимое снижение “длительности однократного плавания” и снижение силы хватки или невыполнение этого рефлекса.

Средние величины регистрируемых показателей рассчитывали общепринятыми статистическими методами с применением программы SigmaPlot 11.0. Полученные данные представлены в виде средних значений со стандартным отклонением ($M \pm SD$). Для сравнения средних величин показателей и установления статистически значимых различий с группой сравнения проводили статистическую обработку по непараметрическому тесту Манна–Уитни. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с фоном использовали непараметрический критерий для парных сравнений Уилкоксона. Для оценки значимости межгрупповых различий альтернативных показателей применяли χ^2 -критерий Пирсона и точный метод Фишера. Различия по сравнению с контролем считали статистически значимыми при $p < 0.05$ и менее.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс, которым в/в однократно и трехкратно вводили РПД ХР гидродинамическим способом, при проведении ЭНМГ выявлены неврологические нарушения, характеристики которых приведены в табл. 1.

При ЭНМГ не выявлено отклонений порога раздражения, что свидетельствует о сохранности элементов чувствительной иннервации. Как при однократном, так и при трехкратном в/в введении РПД ХР с применением гидродинамического введения у крыс прослеживали стойкое снижение амплитуды М-ответа, изменения показателя при трехкратном введении регистрировали в более

Таблица 1. Параметры ЭНМГ крыс в различные сроки после внутривенного введения РПД ХР с применением гидродинамического воздействия ($M \pm SD$, $n = 8$)

Показатель ЭНМГ	Срок регистрации, нед.	Группа/препарат		
		контроль гидропункции РПД	РПД ХР, 1 мг/кг, однократно	РПД ХР, 1 мг/кг, трехкратно
Амплитуда, мВ	1	25.11 $\pm$ 0.28	24.84 $\pm$ 0.44	21.54 $\pm$ 0.39*
	2	25.01 $\pm$ 0.24	24.52 $\pm$ 0.53	22.29 $\pm$ 0.53*
	3	24.94 $\pm$ 0.16	23.00 $\pm$ 0.80*	22.73 $\pm$ 0.26*
	4	24.69 $\pm$ 0.29	22.60 $\pm$ 0.91*	21.20 $\pm$ 0.60*
Длительность М-ответа, мс	1	2.16 $\pm$ 0.03	2.32 $\pm$ 0.06*	2.30 $\pm$ 0.08*
	2	2.13 $\pm$ 0.04	1.99 $\pm$ 0.04	2.06 $\pm$ 0.13
	3	2.13 $\pm$ 0.04	2.10 $\pm$ 0.04	2.02 $\pm$ 0.09
	4	2.05 $\pm$ 0.05	2.13 $\pm$ 0.04	1.96 $\pm$ 0.05
Площадь М-ответа, мВ $\times$ мс	1	32.08 $\pm$ 0.91	33.47 $\pm$ 1.16	25.90 $\pm$ 0.97*
	2	32.17 $\pm$ 0.76	25.98 $\pm$ 1.30*	23.46 $\pm$ 1.48*
	3	31.08 $\pm$ 0.90	24.84 $\pm$ 1.99*	25.93 $\pm$ 1.65*
	4	31.23 $\pm$ 0.88	26.56 $\pm$ 1.52*	22.03 $\pm$ 0.75*

Примечание: * — отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0.05$. Здесь и в табл. 2 и 3.

ранние сроки. Увеличение длительности М-ответа фиксировали в течение 1 нед. после однократного и трехкратного введения РПД ХР. Соответственно сокращалась и площадь ответа: этот интегральный показатель в группе однократного в/в введения снижался через 2 нед. от начала эксперимента, тогда как при трехкратном введении его достоверные отклонения от контроля прослеживали, начиная с 1-й нед. эксперимента. Таким образом, выявлены электрофизиологические признаки нарушений функции нервно-мышечной передачи, проявления которых зависели от кратности в/в введения РПД ХР.

Изменения количества лейкоцитов в крови исследованных групп зависели от кратности применения РПД ХР и не были вызваны использованием метода гидродинамического введения (табл. 2). При однократном в/в введении РПД ХР этот показатель статистически значимо увеличивался только к окончанию периода наблюдения, тогда как при трехкратном введении образца количество лейкоцитов увеличивалось, начиная со 2-й нед. эксперимента, а к окончанию эксперимента наблюдали выраженную лейкопению. Из числа субпопуляций лейкоцитов через 2 нед. после однократного введения РПД ХР статистически значимо возрастало количество лимфоцитов и моноцитов, тогда как количество гранулоцитов снижалось с тенденцией к восстановлению к концу 4-й нед. При трехкратном введении РПД ХР прирост моноцитов отмечали до окончания периода наблюдения. В этот срок фиксировали резкое снижение при восстановлении популяции гранулоцитов к 3-й нед. наблюдения.

В пользу протекания воспалительного процесса у животных, получавших РПД ХР, указывали данные биохимических маркеров (табл. 3). При однократном гидродинамическом введении РПД ХР повышение количества антител к ХР прослеживали на 1–2 нед. эксперимента, и к его окончанию показатель соответствовал контрольным значениям. При трехкратном введении образца нарастание количества антител выявляли как на первой неделе эксперимента, так и через 3–4 нед. после его начала, что предполагало развитие аутоиммунного воспалительного процесса. Уровень IL-1 α резко увеличивался через 1 нед. после введения РПД ХР, а в последующем отмечалась плавная динамика его снижения. Полученные данные позволяли сделать предположение о формировании аутоиммунного воспаления, при этом модель трехкратного введения РПД ХР обеспечивает более длительный и выраженный ответ.

Биологическое действие РПД ХР прослежено в тесте 10%-ным грузом до отказа и силы хвата. По результатам фонового заплыва средняя продолжительность плавания животных во всех группах составляла 143–154 с. После однократного в/в гидродинамического введения РПД (контроль) на 7-е сут фиксировали снижение продолжительности плавания на 11.7% относительно фоновых значений. В последующие сроки тестирования продолжительность плавания животных данной группы повышалась, и к 3-й нед. составила 195 ± 12.5 с. После однократного в/в гидродинамического введения РПД ХР к 3-й нед. продолжительность плавания была на 10% ниже значений контрольной группы. Установлено, что трех-

Таблица 2. Воспалительные изменения популяции лейкоцитов крови крыс в различные сроки после в/в гидродинамического воздействия РПД ХР ($M \pm SD$, $n = 8$)

Показатель, $\times 10^3/\text{мкл}$	Срок регистрации показателя после введения образца, нед.				
	фоновые значения	1	2	3	4
Однократное введение РПД ХР с применением гидропорации					
Лейкоциты	11.4 ± 0.87	12.6 ± 1.29	16.3 ± 2.19	16.1 ± 2.69	$15.8 \pm 1.64^*$
Лимфоциты	6.4 ± 0.64	$9.5 \pm 0.99^*$	$11.1 \pm 1.30^*$	12.9 ± 3.19	$11.4 \pm 1.37^*$
Моноциты	0.6 ± 0.08	$1.71 \pm 0.26^*$	$2.60 \pm 0.43^*$	$1.78 \pm 0.35^*$	$0.88 \pm 0.08^*$
Гранулоциты	4.3 ± 0.58	$1.2 \pm 0.13^*$	$2.5 \pm 0.53^*$	$1.4 \pm 0.21^*$	3.5 ± 0.13
Трехкратное введение РПД ХР с применением гидропорации					
Лейкоциты	11.4 ± 0.87	14.4 ± 1.63	$16.1 \pm 0.91^*$	$17.7 \pm 1.76^*$	$7.3 \pm 0.54^*$
Лимфоциты	6.4 ± 0.64	$11.1 \pm 1.47^*$	$12.2 \pm 0.63^*$	$12.5 \pm 1.41^*$	$3.6 \pm 0.28^*$
Моноциты	0.6 ± 0.08	$1.70 \pm 0.27^*$	$2.03 \pm 0.18^*$	$0.86 \pm 0.08^*$	$1.21 \pm 0.20^*$
Гранулоциты	4.3 ± 0.58	$1.6 \pm 0.19^*$	$1.9 \pm 0.27^*$	4.2 ± 0.75	3.2 ± 0.26

Таблица 3. Накопление антител к ХР и содержание IL-1 α в плазме крови крыс в различные сроки после внутривенного введения РПД ХР с применением гидродинамического воздействия ($M \pm SD$, $n = 8$)

Показатель	Фоновые значения	Кратность введения РПД	Продолжительность наблюдения, сут			
			7	14	21	28
IgG к ХР, мкг/л	0.1 ± 0.04	Однократно	$0.3 \pm 0.04^*$	$0.3 \pm 0.08^*$	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.03
		Трехкратно	$0.5 \pm 0.04^*$	0.2 ± 0.03	$0.3 \pm 0.08^*$	$0.3 \pm 0.04^*$
IL-1 α , мкг/л	0.1 ± 0.07	Однократно	$2.1 \pm 0.74^*$	$2.1 \pm 0.9^*$	1.9 ± 0.97	$1.3 \pm 0.1^*$
		Трехкратно	5.3 ± 2.79	$3.9 \pm 1.62^*$	3.2 ± 2.23	$2.6 \pm 0.53^*$

кратное гидродинамическое в/в введение РПД ХР способствовало снижению длительности плавания крыс на 24% к 3-й нед. эксперимента по сравнению с однократным введением РПД ХР.

На фоне однократного в/в гидродинамического введения РПД ХР показано снижение силы

хвата лап крыс на 2-й нед. на 0.4 ± 0.83 Н по сравнению с фоновыми значениями и к 3-й нед. сила хвата была сопоставима с исходными значениями. Установлено, что трехкратное в/в гидродинамическое введение РПД ХР оказывало влияние на мышечный тонус крыс по сравнению с его однократным введением (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Посредством индукции экспрессии химерного холинорецептора разработана сохраняющая патогенетическое единство с экспериментальной моделью МГ, предполагающая трехкратное внутривенное введение РПД ХР с применением гидродинамического введения. Предложенная схема введения образца обеспечивает выраженный аутоиммунный ответ, сохранение длительности воспалительной реакции на протяжении 4-х недель и снижение физической работоспособности и показателей электронной миографии животных. Разработанная модель потенциально может быть использована при отборе лекарственных средств для терапии аутоиммунных заболеваний холинергической природы.

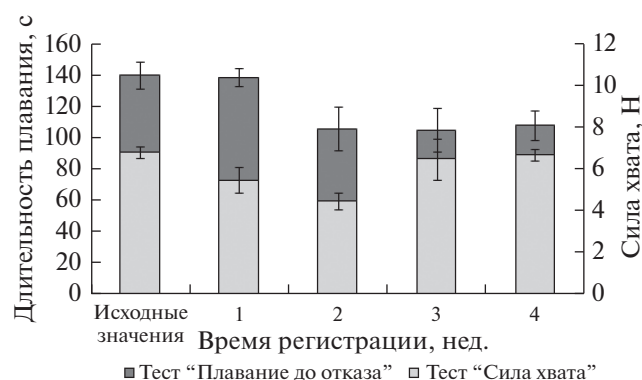


Рис. 1. Мышечная утомляемость у крыс после трехкратного внутривенного гидродинамического введения РПД ХР в тестах "Плавание до отказа" и "Сила хвата", ($M \pm SD$, $n = 8$).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Тюнин М.А., Чепур С.В., Гоголевский А.С. и др. Проблема промежуточного синдрома при отравлениях антихолинэстеразными соединениями // Токсикол. вестн. 2017. Т. 145. № 4. С. 40–49.
- Baggi F., Antozzi C., Toscani C., Cordiglieri C. Acetylcholine receptor-induced experimental myasthenia gravis: what have we learned from animal models after three decades? // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 2012. V. 60. № 1. P. 19–30.
- Behin A., Le Panse R. New pathways and therapeutic targets in autoimmune myasthenia gravis // J. Neuromuscul. Dis. 2018. V. 5. (3). P. 265–277.
- Cao Y., Lu X., Wang J. et al. Construction of an miRNA-regulated drug repurposing candidates for myasthenia gravis // Int. J. Mol. Med. 2017. V. 39. № 2. P. 268–278.
- Fuchs S., Aricha R., Reuveni D., Souroujon M.C. Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG): from immunochemical characterization to therapeutic approaches // J. Autoimmun. 2014. V. 54. P. 51–59.
- Fujii Y.X., Fujigaya H., Moriwaki Y. et al. Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice // J. Neuroimmunol. 2007. V. 189. (1–2). P. 69–74.
- Gilhus N.E., Kerty E., Løseth S. et al. Myasthenia gravis – optimal treatment and acute diagnosis // Tidss. Nor. Laegeforen. 2016. V. 136. № 12–13. P. 1089–1094.
- Mantegazza R., Cordiglieri C., Consonni A., Baggi F. Animal models of myasthenia gravis: utility and limitations // Int. J. Gen. Med. 2016. №. 9. P. 53–64.
- Qian J., Galitovskiy V., Chernyavsky A.I. et al. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in *in vitro* differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th17 lineages // Gen. Immun. 2011. V. 12. P. 222–230.
- Racca F., Vianello A., Mongini T. et al. Practical approach to respiratory emergencies in neurological diseases // Neurol. Sci. 2020. V. 41. № 3. P. 497–508.
- Wang H., Liao H., Ochani M. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 1216–1221.
- Wang H., Yu M., Ochani M. et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation // Nature. 2003. V. 421. (6921). P. 384–388.

Method for Modeling Myasthenia Gravis in Rodents by Inducing Autoimmune Cholinoreceptor Damage

S. V. Chepur^a, M. A. Yudin^a, A. S. Nikiforov^a,
I. M. Ivanov^a, A. N. Alekseev^a, and T. M. Ustinova^a, *

^aState Scientific-Research Test Institute of the Military Medicine, Russian Federation Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia

*e-mail: gniiivm_15@mil.ru

The possibility of modeling myasthenia gravis in rats by intravenous administration of recombinant plasmid DNA encoding a chimeric nACh-receptor, followed by hydroporation or electroporation, is shown. The formation of neuromuscular conduction disorders was evaluated by electroneuromyography in the form of a decrease in the amplitude of the M-response and its decrement, and a decrease in the response area. In a hematological study, an increase in the number of blood lymphocyte and monocyte populations, an increase in the content of antibodies to the cholinoreceptor and the proinflammatory cytokine IL-1 α was observed in dynamics. The developed model is suitable for the selection of medicines for the treatment of myasthenia gravis.

Keywords: myasthenia gravis, nACh-receptor, experimental model

УДК 57.042

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА И РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РЕАЛИЗАЦИИ ЕГО ПОСЛЕДСТВИЙ

© 2021 г. А. В. Выюшина¹, *, Н. Э. Ордян¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: awwa104@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.09.2020 г.

После доработки 06.11.2020 г.

Принята к публикации 06.11.2020 г.

Пренатальный стресс любой этиологии является неотъемлемым фактором эволюции. Активация эпигенетических процессов повышенным уровнем материнских глюкокортикоидов изменяет жизненный путь новорожденных непредсказуемым образом. Разные стрессорные воздействия в разные временные точки эмбриогенеза будут иметь разные последствия, которые также вступают друг с другом в динамические взаимодействия. Одним из драматических результатов таких взаимодействующих процессов является рост психопатологий и нервных заболеваний. Повышение уровня материнских глюкокортикоидов вызывает нарушение редокс-баланса у плода, и как следствие — окислительный стресс, то есть процесс смещения про- и антиоксидантного равновесия в сторону повышения образования активных форм кислорода. Некоторые эпигенетические изменения, которые могут быть причиной нарушений функционирования ЦНС, являются следствием окислительного стресса. Кроме того, в норме и в случае стрессорных воздействий реакция матери опосредуется плацентой, которая как метаболически активный орган обладает и своей системой редокс-баланса, также подвергающегося окислительному стрессу. Плацентарные эпигенетические изменения обладают как положительным, так и негативным воздействием на плод. В обзоре рассматриваются последние исследования, посвященные комплексному анализу многокомпонентной проблемы причин и последствий пренатального стресса.

Ключевые слова: пренатальный стресс, психопатология, эпигенетика, окислительный стресс, плацента

DOI: 10.31857/S0042132421020095

ВВЕДЕНИЕ

Психоэмоциональный стресс является одним из следствий технического прогресса. Особую важность представляет изучение влияния стресса на организм, находящийся в состоянии беременности, в связи с тем, что патологические действия этого фактора выявляются и у последующих поколений. Повышенный уровень материнских гормонов стресса влияет на морфогенез эмбриональных нейронов (Отеллин и др., 2007). В результате изменяется структура поведения, снижаются адаптивные способности у взрослых потомков (Шаляпина и др., 2001; Ордян, Пивина, 2003), что свидетельствует о фундаментальной перестройке функций ЦНС. Одновременно с этим, поведение потомства определяют генетические факторы, условия окружающей среды в послеродовом периоде и качество материнской эмпатии (Weinstock, 2008). В настоящее время имеется большое количество исследований, посвящен-

ных разным факторам, индуцирующим пренатальный стресс, так же, как и последствия этого изучаются по разным маркерам. Однако, очевидно на необходимость комплексного анализа для определения механизмов реализации эффектов пренатального стресса, таких как влияние глюкокортикоидов матери на плод, позитивной или негативной роли эпигенетических изменений и роли окислительного стресса в их индукции. Таким образом, интегрированный подход в исследованиях, посвященных влиянию материнского стресса на потомство мог бы принести большую пользу в понимании данной проблемы. Совмещение психологического и биологического подходов, включающее изучение совместно субъективно воспринимаемого стресса и объективных физиологических показателей стрессовых реакций у беременных женщин, влияние этих стрессовых реакций как на развитие плода, так и на ребенка, а также роль материнского поведения и эмпатии во взаимоотношениях с ребенком при

наличии фактора пренатального стресса может быть таким интегративным подходом.

БЕРЕМЕННОСТЬ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТРЕСС

Влияние повышенного уровня глюкокортикоидов в процессе развития организма является ключевым гормональным сигнальным путем, через который реализуются долгосрочные фенотипические эффекты, связанные с неблагоприятными условиями в раннем возрасте. Эти эффекты проявляются на протяжении всей жизни. Воздействие стресса в период раннего пренатального и неонатального развития может долговременно влиять на физиологию и поведение человека. К настоящему времени опубликовано большое количество исследований, освещающих роль глюкокортикоидов в механизмах пренатального стресса (Резников и др., 2004; Отеллин и др., 2007; McGowan, Matthews, 2018; Krontira et al., 2020).

Большинство таких исследований произведено, по понятным причинам, на животных, поэтому особый интерес представляют исследования, выполненные на выборке из человеческой популяции. Дэвис с соавт. (Davis et al., 2011) провели исследование на выборке, состоявшей из 116 женщин и доношенных детей, для определения пренатального действия повышенных уровней глюкокортикоидов и материнского стресса как предполагаемых механизмов для фетального программирования здоровья родившихся детей. Было обнаружено, что реакция повышенного выброса кортизола у детей на процедуру раздражения пятки палочкой была связана с воздействием повышенных концентраций материнского кортизола в конце второго и третьего триместра беременности. При этом, более медленная скорость восстановления уровня кортизола была связана с повышенным уровнем материнского кортизола на ранних сроках беременности, а кроме того и с пренатальным материнским психосоциальным стрессом на протяжении всей беременности. Эти результаты не коррелировали со способом родоразрешения, болезнью в пренатальном анамнезе, социально-экономическим статусом или расой ребенка, полом или порядком рождения. Таким образом, воздействие материнского кортизола и психосоциального стресса оказывает программирующее воздействие на развивающийся плод с последующим влиянием на детскую стрессореактивность.

В то же время появляются новые данные о том, что влияние пренатального стресса на развитие потомства зависит от пола. В исследовании на людях с использованием данных проспективной лонгитюдной когорты, стратифицированной по степени риска, были выделены половые различия

в пренатальном программировании плода материнским кортизолом (Braithwaite et al., 2017). Авторы выявили, что в возрасте 5 нед. у младенцев женского пола повышается количество негативных эмоциональных реакций после воздействия высокого уровня материнского кортизола в течение беременности по сравнению с младенцами, родившимися у матерей с нормальным уровнем кортизола, в то время как у младенцев мужского пола эти показатели снижаются. Половые различия в реализации эффектов пренатального стресса были выявлены в нашей лаборатории при исследовании на крысах (Ордян, Пивина, 2003; Ордян и др., 2020). Было установлено, что у пренатально стрессированных самцов снижена скорость торможения гипоталамо-адреналокортикальной системы (ГАС) после стресса, тогда как у самок значительно увеличивается уровень стрессорного выброса кортизола со сходной с контролем скоростью торможения ГАС.

Однако в ряде публикаций отмечается многофакторность и полимодальность реакций развивающегося организма в реализации эффектов пренатального стресса. Так, например, еще в 1998 г. Штюр с соавт. (Stöhr et al., 1998), исследуя долгосрочные последствия пренатального стресса (иммобилизационный стресс крыс-матерей три раза в день в течение последней недели беременности) в двух инбредных линиях крыс, Фишер 344 (F344/NHsd/Zur) и Льюис (LEW/SsNHsd/Zur), показали, что пренатальный стресс изменяет поведение крыс, и эти изменения зависят от принадлежности к генетической линии.

Грэйжник-Филипп с соавт. (Graignic-Philippe et al., 2014) считают, что необходимо оценивать индивидуальную стрессореактивность отдельно в каждом триместре беременности. Также следует отличать хронический стресс от острого и принимать во внимание другие факторы, влияющие одновременно со стрессом (события, происходившие в жизни, социокультурные факторы и др.). Кроме того, по мнению авторов, было бы полезно проводить исследование уровня стресса, тревоги и депрессии одновременно, как во время беременности, так и после нее, для того, чтобы оценить их специфическое воздействие на беременность и развитие ребенка.

В обзоре (St-Cyr, McGowan, 2018) при анализе более 40 исследований, выполненных на грызунах, делается вывод: пренатальный стресс является программирующим фактором, который может привести к развитию градиента фенотипов от адаптивного до патологического. Экологически значимые стрессоры, присутствующие в природе и представленные с физиологической интенсивностью, обеспечивают эволюционную основу для разработки экологически приемлемого ответа.

В работе (Bolten et al., 2013) была выявлена связь между увеличением материнского кортизола в ответ на стресс во время беременности и регуляцией эмоций у ребенка в возрасте шести месяцев. При этом базальный уровень кортизола матерей после пробуждения (утренний уровень кортизола) в середине и в конце беременности не были связаны с эмоциональным статусом ребенка. Авторы, исследовав характеристики темперамента родившихся детей, предполагают, что генетически детерминированный темперамент младенцев смягчает пренатальное воздействие окружающей среды на постнатальную регуляцию эмоций.

С другой стороны, в последнее время появились публикации, предполагающие нейтральную или даже позитивную роль пренатального стресса. Ряд исследователей призывают с осторожностью экстраполировать данные научных работ, в том числе и проведенных на выборках беременных женщин, на всю когорту беременных и предостерегают от наведения панических настроений у беременных матерей. Так, одна из статей называется “Программирование влияния пренатального стресса на нейроразвитие — ловушка самореализующегося пророчества” (Bleker et al., 2019), где отмечается рост интереса как в научной литературе, так и в общественной прессе, к потенциально вредным эффектам пренатального стресса на организм человека и развитие мозга плода. Однако авторы отмечают, что “стресс — это термин-зонтик”, и исследования материнского стресса были сосредоточены на широком спектре ситуаций, вызывающих стресс, начиная от ежедневных неприятностей до травматического стресса после тяжелой утраты или стихийного бедствия. Кроме того, подавляющее большинство исследований на людях являются наблюдательными когортными исследованиями, в которых затруднительно показать для каждого конкретного индивидуума причинную связь нарушений здоровья с последствиями пренатального стресса. Помимо этого, ограничены знания о возможных глубинных механизмах пренатального стресса, а также о влиянии мероприятий по борьбе с пренатальным стрессом на исходы детского нервно-психического развития. Пока у нас нет лучшего понимания, отмечают авторы, было бы контрпродуктивным тревожить всех беременных женщин по поводу возможных вредных эффектов всех видов пренатального стресса, хотя бы для того, чтобы избежать индукции самого стресса (Bleker et al., 2019).

Чувствительность ГАС, по-видимому, калибруется ранним жизненным опытом, и этот факт связан с существенными последствиями для поведения, уменьшением теломер и соответствующим снижением продолжительности жизни (Monaghan, Haussmann, 2015). С другой стороны, эти авторы считают, что воздействие умеренного

стресса в раннем возрасте может оказывать и благотворное влияние на стабильность организма.

В тоже время наблюдается значимое влияние адаптивных перестроек на развитие систем организма пренатально стрессированного потомства. Различия в росте между пренатально стрессированным потомством и контрольной группой меняются в зависимости от времени действия стрессора во время беременности и исследуемым периодом развития (Berghänel et al., 2017). Авторы проверили эти прогнозы с помощью сравнительного анализа 719 исследований по 21 виду млекопитающих. Наблюдаемые изменения роста в ответ на материнский стресс варьировали во все периоды развития потомства. При этом потомство, подвергшееся воздействию материнского стресса, может расти с той же скоростью, что и группа контроля во время беременности и лактации, но будет расти быстрее после отлучения от груди, когда прямой материнский энергетический вклад отсутствует. Авторы считают, что наблюдаемое ускорение роста после отъема потомства у матери не является “догоняющим фактором роста”, потому что потомство, которое характеризовалось меньшими размерами, чем должно быть в исследуемом возрасте, росло медленнее. Следует отметить, что только воздействие пренатального стресса на ранних сроках беременности приводит к адаптивной пластичности роста.

Эффекты пренатального стресса могут возникать не только непосредственно под влиянием пренатального стресса, но и опосредованно через влияние стресса на здоровье матери и протекание беременности, что также влияет на здоровье и развитие младенцев. Исследования на животных и людях свидетельствуют о том, что активация материнской стрессорной реакции и обусловленные ею реакции эндокринной и иммунной систем играют определенную роль в этиологии эффектов пренатального стресса (Coussons-Read, 2013).

Существуют сильные индивидуальные различия в воздействии пренатального стресса. В то время как некоторые люди кажутся уязвимыми перед этим фактором, другие, по-видимому, относительно устойчивы к его воздействию. Очевидно, здесь имеют значение существующие врожденные различия как в стрессоустойчивости матерей, так и в их стратегиях преодоления стресса. Одновременно существуют некоторые врожденные различия в стрессоустойчивости и стратегии преодоления стресса у развивающихся плодов, что может повлиять на индивидуальный риск развития метаболических и других патологий. Этот врожденный риск, по-видимому, модулируется пренатальной средой, и в зависимости от генотипа плода воздействие пренатального стресса может иметь неблагоприятные или защитные свой-

ства. Следует отметить, что прогнозирование риска является еще более комплексным, поскольку послеродовая среда также взаимодействует как с генотипом, так и с пренатальным окружением.

В качестве примера: крысы, генетически отобранные для пассивной стратегии преодоления стресса, имеют повышенный риск развития ожирения. Однако фенотип ожирения у таких крыс становится очевидным только тогда, когда животные подвергаются воздействию диеты с высоким содержанием жиров. Воздействие пренатального стресса на крыс, не подвергнутых генетическому отбору по стратегии поведения, индуцирует более экстремальную стратегию преодоления стресса по сравнению с теми, кто не подвергался пренатальному стрессу, и поэтому также увеличивает риск ожирения (Boersma, Tamashiro, 2015). Здесь можно рассуждать о том, что наличие более экстремального стиля преодоления стресса выгодно при угрозе условий окружающей среды, а наличие стресса у матери может обозначить эти будущие условия окружающей среды, что сделает развивающийся плод подготовленным к этим условиям.

Кроме того, при прогнозируемых стрессогенных условиях окружающей среды, энергосбережение будет адаптивным. Однако, когда животное постнатально подвергается воздействию среды, богатой энергией, такой как доступ к диете с высоким содержанием жиров, а стрессогенность окружающей среды оказывается низкой, эта адаптивная стратегия приводит к обратным последствиям и подвергает животное риску ожирения. В этом случае несоответствие между пренатальной средой и послеродовой окружающей средой ведет к патологии (Boersma, Tamashiro, 2015).

Глюкман и Хансон (Gluckman, Hanson, 2004) высказали гипотезу, о том, что родители подготавливают (программируют) организм их потомков к тем неблагоприятным воздействиям, с которыми он может встретиться после рождения. Такое программирование касается особенностей метаболизма, специфической поведенческой и гормональной реакции на стрессорные воздействия, социальных взаимоотношений и регуляции репродуктивных функций, как одной из важнейших составляющих поддержания целостности популяции. В том случае, если условия окружающей среды, в которой оказывается такой потомок, совпадают с “прогнозируемыми”, то изменение его фенотипа оказывается адаптивным. В противном случае фенотипическая модификация физиологических функций снижает адаптационный потенциал потомков и служит причиной развития многочисленных болезней адаптации.

Гузман с соавт. (Guzman et al., 2006) провели крайне интересное исследование, в котором изучили влияние ограничения потребления матерями белка во время развития плода и/или лактации у крыс на функцию репродуктивной системы и продолжительность жизни потомства женского пола. Крыс кормили либо контрольной диетой (К), либо ограниченной по белку диетой (О) во время беременности. После родов матери получали либо диету К, либо О до отлучения потомства от матери, и таким образом получили четыре группы: КК, ОО, КО и ОК. Результаты этих исследований показали, что сроки открытия влагалища и первого эструса происходили с задержкой в группах ОО и КО. Показатели рождаемости снижались в трех экспериментальных группах, но не в КК. Ограничение материнского белка в одном из двух экспериментальных периодов — беременность или лактация (КО или ОК) — приводило к снижению продолжительности жизни крыс по сравнению с КК и ОО. Самая коротко живущая группа в исследовании была ОК, а самая длительно живущая — ОО. Другими словами, диета с ограничением потребления белка как в течение пренатального развития, так и в ранний постнатальный период, хотя и имела негативные последствия для скорости полового созревания, но значительно увеличивала продолжительность жизни потомков женского пола.

В естественных условиях среды обитания значительное увеличение численности популяции и/или снижения доступа к пищевым ресурсам является сильным стрессорным фактором. На фоне общего снижения фертильности и самцов, и самок в результате стресса численность популяции постепенно снижается. “Популяционному” стрессу подвергаются и беременные животные. В результате потомки этих животных должны обладать таким фенотипом, который позволит им оптимально приспособиться к последующему изменению среды обитания, а любые изменения репродуктивных функций и/или уменьшение числа новорожденных являются адаптивными.

Нами было выполнено исследование, в котором оценивали регулярность и продолжительность эстральных циклов половозрелых самок крыс, родившихся от матерей, которых в последнюю треть беременности подвергали ежедневному стрессорному воздействию. После отъема от матери в 30-дневном возрасте таких самок содержали либо поодиночке, либо в переполненных группах (10–12 особей на клетку). Таким подходом мы пытались смоделировать ситуацию, наблюдаемую при резком снижении или увеличении плотности популяции. Несмотря на то, что самки имели неограниченный доступ к воде и пище, анализ длительности эстрального цикла и продолжительности его отдельных стадий показал, что около 50% контрольных и пренатально

стрессированных самок крыс, выросших в условиях изоляции, характеризуются укорочением длительности эстрального цикла. Остальные животные имели либо нормальную продолжительность эстрального цикла, либо удлиненную. При этом у контрольных самок увеличение длительности эстрального цикла происходило за счет стадии диэструса, тогда как у пренатально стрессированных животных удлинялся эструс (Шамолина и др., 2010). Стресс, вызванный содержанием в переуплотненных группах, приводил к увеличению длительности эстрального цикла за счет диэструса у большинства самок контрольной и пренатально стрессированной групп. После оптимизации жилищных условий (перевод на содержание по 5–6 особей в клетке) около 40% пренатально стрессированных крыс сохраняли длительный эстральный цикл, тогда как все контрольные крысы демонстрировали нормализацию продолжительности эстрального цикла (Пивина и др., 2007).

По нашему мнению, пренатально стрессированные животные в условиях низкой плотности популяции демонстрируют более адаптивную реакцию, так как укорочение эстрального цикла и удлинение стадии эструса увеличивает вероятность наступления беременности. Напротив, при повышении плотности популяции, изменения репродуктивных функций пренатально стрессированных самок направлены на снижение фертильности и, соответственно, снижение численности популяции. Следует отметить, что у пренатально стрессированных самок, выросших в стандартных условиях, в молодом возрасте наблюдали те или иные нарушения уровня половых стероидов и морфометрических характеристик матки (Шамолина и др., 2009; Пивина и др., 2010). Очевидно, представляет интерес тот факт, что воздействие используемого в нашем эксперименте иммобилизационного стресса беременных крыс-самок на гормональные циклы родившихся у них самок сходно с последствиями пищевых дефицитов, исследованных в 50-х гг. XX в. (Nelson, Evans, 1954).

Приведенные данные подтверждают идею о “прогнозируемой” модификации фенотипа на ранних этапах развития, которая повышает шанс на выживаемость в конкретных условиях обитания. Поскольку такие модификации фенотипа опосредованы в основном эпигенетическими механизмами, протекающими в процессе развития, некоторые из последствий могут быть необратимыми. Понимание этих многообразных и взаимосвязанных механизмов адаптации или дезадаптации, возникающих в результате воздействия неблагоприятных факторов на ранних этапах онтогенеза, может предоставить нам в будущем новые цели для разработки терапевтической коррекции последствий пренатального стресса (Boersma, Tamashiro, 2015).

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА РАЗВИТИЕ ПСИХОПАТОЛОГИИ

Как видно из анализа литературы, разные виды пренатальных стрессорных воздействий имеют сходные последствия для потомства. Тем не менее, в последнее время уделяется большое внимание влиянию пренатального стресса на развитие психических заболеваний у потомков. Так, Абботт с соавт. (Abbott et al., 2018) отмечают, что, хотя некоторые специфические физиологические (иммунная активация, недоедание и низкий вес при рождении) и токсические стрессоры (алкоголь и пестициды и т.п.) имеют большое значение как пренатальные факторы риска возникновения нервно-психических заболеваний, именно психологический стресс в течение пренатального периода представляет особый интерес по нескольким причинам. Во-первых — психологический стресс может индуцироваться разнообразными факторами. Во-вторых — последствиями психологического стресса являются изменения во всех физиологических системах человека. В-третьих, психоэмоциональный стресс является распространенным явлением, которое может происходить в любые периоды в течение всего срока беременности и во всем социально-экономическом спектре, а также в течение кратких или длительных периодов времени. В совокупности, исследования этих причин преследуют цель более глубокого научного понимания этиологии нервно-психических заболеваний.

В одном из последних исследований (Gur et al., 2019) отмечается, что внутриутробное и раннее неонатальное воздействие материнского стресса, связанного с психическими расстройствами, в настоящее время активно изучается с целью выявления механизмов, лежащих в основе этих расстройств. Авторы использовали в качестве модели пренатальный стресс у беременных мышей для изучения новых взаимосвязей между воздействием пренатального стресса, изменениями в микробиоме кишечника и социальным поведением. Было показано, что самцы, подвергшиеся пренатальному стрессу, имели значительное снижение времени социальных контактов в тесте социального поведения во взрослом возрасте с повышенным высвобождением кортикостерона после социального взаимодействия. Пренатально стрессированные мыши-самцы демонстрировали повышенные уровни маркеров нейровоспаления (IL-6 и IL-1 β), снижение уровня рецепторов окситоцина и снижение метаболизма серотонина в коре головного мозга в зрелом возрасте, что было связано с изменениями показателей социального поведения. Кроме того, обнаружено значительное различие в комменсальных микробах, включая снижение содержания бактериоидов у пренатально стрессированных животных.

Различные факторы внешней среды, действующие в течение критических периодов развития (Светлов, 1960), могут оказывать негативное влияние на рост и дифференцировку нервной системы. В дальнейшей жизни это может способствовать предрасположенности индивида к различным патологическим психическим состояниям, которые часто имеют как компонент когнитивные нарушения. Поскольку когнитивные симптомы остаются одним из наиболее сложных и резистентных аспектов психических заболеваний, подлежащих фармакологическому лечению, важно исследовать механизмы, лежащие в основе этих симптомов. Пренатальные стрессовые воздействия играют ключевую роль в формировании памяти и обучающих функций, связанных с определенными структурами мозга, такими как гиппокамп и префронтальная кора (Richetto, Riva, 2014). Авторы отмечают, что будущие исследования должны быть сосредоточены на изучении механизмов, способствующих конвергентному влиянию различных пренатальных воздействий, с тем, чтобы определить мишени для нового терапевтического вмешательства.

Следует отметить, что потомство обоих полов восприимчиво к заболеваниям, вызванным пренатальным стрессом, но его последствия варьируют для потомства мужского и женского пола в зависимости от гестационного возраста, возможно в зависимости от стадии развития определенных областей и контуров мозга, систем стрессактивации и стресслимитирования и иммунной системы. Биологическими коррелятами у пренатально стрессированного потомства являются: aberrации в развитии нервной системы, когнитивной функции, церебральном процессинге, в функциях и взаимодействии амигдалы и префронтальной коры головного мозга, функций ГАС и автономной нервной системы (Van den Bergh et al., 2017).

Ранние изменения биологических систем могут иметь и адаптивное значение. Воздействие стресса в раннем возрасте может иметь благотворное влияние на устойчивость к стрессу в дальнейшей жизни (Monaghan, Haussmann, 2015), но это преимущество имеет свою цену, а именно — атипичное развитие мозга (Отеллин и др., 2007).

Британский эпидемиолог Баркер с соавт. (Barker et al., 1989) зафиксировали взаимосвязь между весом ребенка при рождении и развитием гипертонии, ишемической болезнью сердца, инсулинорезистентностью и диабетом 2-го типа. Такого рода взаимосвязи в настоящее время обозначаются как пренатальное программирование. Пренатальное программирование чаще всего происходит через эпигенетические механизмы и зависит от типа и времени воздействия, а также от пола плода. В обзоре Ким с соавт. (Kim et al., 2015)

представлены самые последние доказательства того, что пренатальное программирование вовлечено в развитие психических расстройств у потомства, родившегося от матерей, которые испытывали стресс во время беременности. Следует отметить, что методологические различия между исследованиями способствуют неизбежной неоднородности результатов исследований.

Таким образом, пренатальный стресс любой этиологии вызывает долговременные последствия, которые зависят от пола, вида и интенсивности стресса, генетического фона как матери, так и плода. Особое значение придается психоэмоциональному стрессу и последующим психическим и нейробиологическим нарушениям, поскольку это имеет большое практическое значение в современном обществе. Долгосрочные последствия пренатального стресса, в том числе трансгенерационные, во многом являются следствием эпигенетических изменений.

ЭПИГЕНЕТИКА И ПРЕНАТАЛЬНЫЙ СТРЕСС

Многочисленные исследования показали, что эпигенетические изменения, то есть молекулярные метки, регулирующие активности генов, но не изменяющих первичную структуру ДНК, например, метилирование генов и ацетилирование гистонов, являются одними из возможных последствий пренатального стресса (Cao-Lei et al., 2017; Mattern et al., 2019). Внесенные изменения могут быть “молчащими” процессами, которые могут лежать в основе феноменов риска пренатального стресса, при котором биологические изменения происходят в раннем возрасте, но не проявляют себя до более позднего времени. Эмбриональное развитие захватывает особенно сложный период, в котором генетические факторы и факторы внешней среды могут взаимодействовать, чтобы внести свой вклад в риски развития потомства. Факторы окружающей среды воздействуют на эмбриональный мозг иначе, чем на мозг в постнатальном периоде. Паттерны экспрессии некоторых генов являются не только потенциальным субстратом для пренатального стресса в результате взаимодействия генов, но пренатальный стресс может также определять задержки или ускорения в запуске трансляции генов. Влиянию пренатального стресса могут быть подвержены белки и элементы нуклеиновых кислот, которые участвуют в генетической регуляции, включая факторы транскрипции, микроРНК и эпигенетические модификации.

Эпигенетические изменения направлены на адаптацию организма к изменяющимся условиям его существования. Эпигенетические метки, участвующие в этих процессах, включают метилирование ДНК и гидроксиметилирование, ги-

стоновые модификации, АТФ-зависимое хроматин-ремоделирование и некодирующие РНК (нкРНК). Эпигенетические изменения сохраняются в ряде митотических делений соматических клеток, а также могут передаваться следующим поколениям, если эти изменения произошли в половых клетках (Дыбан, 1988). Тем не менее, большинство исследований эпигенетических изменений после пренатального стресса были сосредоточены на метилировании ДНК, микроРНК и нкРНК. Было показано, что нкРНК регулируют транскрипцию генов, а также стабильность хроматина (Zhou et al., 2010). Такие нкРНК включают в себя короткие микроРНК, piwiРНК и длинные нкРНК (Filipowicz et al., 2008). Важно иметь в виду, что даже если эти эпигенетические компоненты часто изучаются отдельно, они взаимодействуют, чтобы оказать комбинированное воздействие на модуляцию транскрипции генов. Эти метки могут быть первыми не только для текущей, но и для будущей модификации экспрессии генов. Истинная природа таких взаимосвязей может быть раскрыта только в том случае, если параллельно проводятся лонгитюдные, а также межпоколенческие эпигенетические исследования.

В настоящее время ряд исследований указывают на то, что эпигеном реагирует на внешние воздействия, как в период внутриутробного развития, так и после рождения ребенка, а эпигенетические эффекты воздействия стресса могут передаваться следующему поколению (Essex et al., 2013; Provençal, Binder, 2015). Один из возможных механизмов этого феномена представлен в работе Браннер с соавт. (Brunner et al., 2014), которые выявили изменения гистонов в сперме, причем эти изменения могут быть стабилизированы и вследствие этого могут передаваться следующему поколению через зародышевую линию.

Поскольку материнские медиаторы действуют в течение критического периода развития, можно было бы постулировать, что высокий материнский уровень глюкокортикоидов и измененное материнское поведение после стресса вносят свой вклад в долгосрочные эффекты, описанные в потомстве, через эпигенетические модификации. В исследовании на крысах было выявлено, что гиперактивность ГАС играет решающую роль, изменяя адаптационные процессы у крыс с пренатальным стрессом, и эти изменения зависят от пола животного. Для самцов крыс это выражается в снижении пластичности гиппокампа, то есть снижении нейрогенеза и глюкокортикоидных рецепторов, а также в повышенной экспрессии белковых факторов Fos, PSA-NCAM и BDNF, в то время как самки крыс, по-видимому, лучше защищены от влияния пренатального стресса на пластичность гиппокампа (Darnaudéry, Maccari, 2008).

При изучении влияния пре- и постнатальных стрессорных воздействий на эпигенетические процессы авторы другого исследования (Mattern et al., 2019) делают вывод, что воздействия в пренатальный период развития, по-видимому, имеют большее влияние на эпигеном мозга взрослого животного, чем постнатальные переживания. При этом положительные воздействия в пренатальный период развития могут увеличивать количество паттернов метилирования в генах, участвующих в программировании развития стрессоустойчивости в более позднем возрасте. То, что все наблюдаемые межгрупповые различия были специфичны для пола, согласуется с различиями в динамике развития мужского и женского мозга. Многократные изменения и малые размеры эффекта согласуются с многофакторной моделью пренатального программирования поведения взрослых.

Попытка систематического анализа известных к настоящему времени гипотез механизмов пренатального стресса проведена в работе (Conradt et al., 2018). Авторы предполагают, что имеется возможность составить карту происхождения многих физических, психологических и медицинских отклонений и патологий до рождения ребенка. В настоящее время делаются попытки описать и интегрировать две доминирующие модели последствий пренатального стресса: модель кумулятивного стресса (подход, ориентированный на негативные последствия) и модель соответствия/несоответствия (эволюционно-развивающийся подход к последствиям пренатального стресса). Однако, Конрад с соавт. (Conradt et al., 2018) отмечают недостаток этих моделей — внимание только к метаболически ориентированному пренатальному программированию. Третья модель — биологическая чувствительность к контексту (Boyce, Ellis, 2005) основывается на трех важных допущениях. Во-первых, индивидуальные различия в величине биологических стрессовых реакций регулируют восприимчивость к влияниям окружающей среды (патологическим и защитным). Во-вторых, ранний жизненный опыт адаптивно калибрует системы реагирования на стресс в соответствии с контекстами развития. В-третьих, паттерны реагирования на стресс могут изменяться в течение чувствительных периодов развития в зависимости от воздействия окружающей среды. Конрад с соавт. (Conradt et al., 2018) проанализировали контекстную модель в сочетании с моделями кумулятивного стресса и соответствия/несоответствия и предложили новый набор гипотез относительно эпигенетических механизмов, посредством которых пренатальные и постнатальные переживания программируют стрессовую реактивность ребенка и, в свою очередь, способствуют развитию адаптивных и дезадаптивных фенотипов. Эти авторы сформулиро-

вали ряд из четырех проверяемых гипотез, выделяющих эпигенетические механизмы, с помощью которых пренатальный и постнатальный опыт может программировать детскую стрессовую реактивность и, в свою очередь, риск для психопатологии. Первые две гипотезы связаны с эпигенетическими изменениями плода и новорожденного, следующие две связаны с эпигенетическими изменениями плацентарных ДНК.

Рассмотрим эти гипотезы подробнее: 1) постоянное воздействие низкоинтенсивного стресса, как пренатально, так и постнатально, способствует метилированию ДНК, связанному с низкой или умеренной реактивностью на стресс (в соответствии с моделью кумулятивного стресса и контекстной модели (Murgatroyd et al., 2015)). Стабильно низкие уровни воздействия стресса в пренатальном и постнатальном периодах должны способствовать разработке таких стратегий жизнедеятельности, которые соответствуют безопасным, стабильным контекстам (согласно модели соответствия/несоответствия) и низкому риску психопатологии; 2) последовательные высокоинтенсивные стрессовые воздействия, как пренатально, так и постнатально, способствуют метилированию ДНК генов, связанных с усилением регуляции систем реагирования на стресс в раннем возрасте. Этот адаптированный к стрессу профиль реактивности должен способствовать разработке иных жизненных стратегий, которые соответствуют более высоким контекстам неблагоприятного окружения (согласно модели соответствия/несоответствия) и повышенному риску психопатологии (в соответствии с моделью кумулятивного стресса); 3) высокоинтенсивные пренатальные стрессовые воздействия способствуют метилированию ДНК плацентарных генов, связанных с повышением регуляции систем реагирования на стресс и высокой реактивностью младенцев на стресс (Pena et al., 2012; Nugent, Bale, 2015). Поскольку высокая стрессовая реактивность повышает восприимчивость к влиянию окружающей среды, дети с адаптированным к стрессу профилем реактивности, которые растут в безопасной, стабильной постнатальной среде, должны “перекалиброваться”. Это приводит к постнатальным эпигенетическим модификациям, которые поддерживают более низкую стрессовую реактивность и более медленную стратегию жизненного цикла и, следовательно, более низкий риск психопатологии; 4) низкоинтенсивные воздействия пренатального стресса способствуют метилированию ДНК плацентарных генов, связанных со снижением функциональной активности систем реагирования на стресс и низкой или умеренной реактивностью младенцев на стресс (Del Giudice et al., 2011; Murgatroyd et al., 2015). Последующее воздействие суровой, непредсказуемой постнатальной среды должно привести к

повторной “калибровке”, что, в свою очередь, приведет к постнатальным эпигенетическим модификациям, которые повышают реактивность детского стресса (стимулируя профиль реактивности, адаптированный к стрессу) и поддерживают развитие более быстрой стратегии жизненного цикла и, следовательно, более высокий риск для психопатологии.

Эти гипотезы могут пересматриваться в зависимости от имеющихся эмпирических данных. Для оценки этих гипотез авторы считают необходимым провести дополнительные исследования, включающие оценки эпигенетических модификаций пре- и постнатально на различных типах тканей. Только тогда можно будет приблизиться к построению более полной картины того, как пренатальные условия калибруют или не калибруют системы реагирования на стресс и, в свою очередь, адаптивное и дезадаптивное развитие (Conradt et al., 2018).

Достижения в области молекулярной биологии выделили роль эпигенетических механизмов в регуляции активности генов, связанных с поведением и потенциальную роль экологически индуцированных эпигенетических вариаций. Среди прочих выявлены дифференцированно метилированные гены, которые вовлечены в развитие мозга, это гены в пределах вазопрессинергических, серотонинергических, глутаматергических и ГАМК-путей. В эксперименте на мышах выявлено влияние метилирования определенных генов в плаценте стрессированных мышей (*Igf2*, *Gnas*, *Lep*, *Meg3*), а также изменения экспрессии ДНК-метилтрансферазы 1, увеличение метилирования ДНК 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы 2 (11 β -HSD2). По результатам этих исследований можно предположить, что плацента является центральной мишенью материнского дистресса и ключевой механистической связью между материнским дистрессом и потомством. Постнатальные воздействия могут оказывать критическое сдерживающее влияние на пренатальные эффекты и пренатально-постнатальное взаимодействие и развитие ребенка, а также эпигенетические последствия постнатальных взаимодействий матери и ребенка. Внутриутробная среда как таковая, регулируется плацентарной функцией, в связи с этим очевидна необходимость в более подробных исследованиях восприимчивости плаценты к материнскому дистрессу и ее эпигенетической дисрегуляции (Pena et al., 2012; Nugent, Bale, 2015). Интеграция исследований в области пренатального стресса, плацентарной функции и послеродовой материнской заботы с исследованием эпигенетических механизмов могут дать новые представления о патофизиологии, индуцированной материнским стрессом (Monk et al., 2012).

РОЛЬ ПЛАЦЕНТЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА

Некоторая систематизация проведенных в настоящее время исследований упоминалась в предыдущем разделе в обзоре гипотез (Conradt et al., 2018). Рассмотрим более подробно проведенные в настоящее время исследования, посвященные взаимосвязи плаценты и последствий пренатального стресса.

Доступ материнских глюкокортикоидов к глюкокортикоидному рецептору (NR3C1) в плаценте и плоде регулируется обменом веществ через ферменты HSD11B1 и HSD11B2, а также через гликопротеин с множественной лекарственной устойчивостью, опосредующий отток глюкокортикоидов из синцитиотрофобласта. В работе (Mark et al., 2009) показано, что динамические паттерны экспрессии генов *Hsd11b1* и *Hsd11b2* плацентарных ферментов HSD11B1 и HSD11B2 в поздние сроки беременности связаны с резкими сдвигами уровня кортикостерона в плаценте. Более того, рост экспрессии гена *Hsd11b1* в поздние гестационные сроки в зоне лабиринта, по-видимому, управляется нормальным предродовым падением уровня прогестерона.

Плацентарный кортикотропин-рилизинг-гормон (ПКРГ) является фетоплацентарным сигналом стресса, который также формирует нейродинамическое развитие плода наряду с материнскими гормонами и может быть более точным индикатором состояния плода, чем материнские гормоны стресса. По данным Холанд с соавт. (Howland et al., 2016), плацентарные профили ПКРГ (включая подъемы в середине беременности) были связаны с выраженными симптомами эмоциональных и поведенческих расстройств (МКБ-10, Международная классификация болезней 10-го пересмотра версия: 2019) у детей в возрасте 5 лет. Этот эффект не был объяснен критическими пренатальными или постнатальными последствиями, такими как акушерский риск, сопутствующее материнское психологическое состояние и социально-экономическое состояние семьи. Пренатальный материнский кортизол не был достоверно связан с интернализирующими симптомами ребенка. Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенное воздействие ПКРГ-сигнала фетоплацентарного стресса влияет на развивающуюся центральную нервную систему плода с длительными последствиями для здоровья ребенка.

Во время беременности плацента является местом активного кислородного обмена, что может быть причиной окислительного стресса (ОС). Перепроизводство активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (НО) может разрушить нормальные функции плаценты. Фетоплацентарная единица характеризуется высоким уровнем антиоксидантов, чтобы держать ОС под

контролем. Контролируемое образование АФК и НО служит незаменимыми клеточными сигналами, регулируемыми экспрессию генов и нисходящие клеточные процессы (Арутюнян и др., 2010). ОС также играет важную иммунорегуляторную роль во время беременности. Нерегулируемый ОС и иммунные нарушения связаны между собой при неблагоприятных исходах беременности, таких как самопроизвольный аборт, преэклампсия и задержка внутриутробного развития (Wu et al., 2016).

Плацентарный ОС играет ключевую роль в патофизиологии расстройств, связанных с плацентой, особенно таких, как преэклампсия и задержка внутриутробного развития. ОС повреждает ДНК, белки и липиды, но находится под контролем антиоксидантных ферментов. Разоблачающий белок митохондрий 2 (UCP2) может также ограничивать окислительный стресс путем снижения производства АФК. Джонс с соавт. (Jones et al., 2010) охарактеризовали антиоксидантную защиту плаценты крыс во время нормальной беременности и после задержки внутриутробного развития, индуцируемой глюкокортикоидами (дексаметазоном). Плаценты были собраны на 16-й и 22-й дни беременности. Экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, (*Sod1*, *Sod2*, *Sod3*, *Cat*, *Gpx3*, *Txn1*, *Txnrd1*, *Txnrd2* и *Txnrd3*) и UCP2 были измерены количественным методом RT-ПЦР в лабиринтной (ЛЗ) и соединительной (СЗ) зонах плаценты. Экспрессия *Sod1* и мРНК UCP2 и активность ксантиноксидазы, являющейся источником АФК, были увеличены с 16-го по 22-й день в обеих плацентарных зонах, тогда как *Sod2* и *Gpx3* увеличились только в быстрорастущей ЛЗ. В отличие от этого, экспрессия *Sod3* и *Txnrd1* упала в ЛЗ, тогда как общая активность СОД продолжала оставаться стабильной. Введение дексаметазона уменьшило фетально-плацентарный рост и экспрессию UCP2 в ЛЗ, но увеличило экспрессию *Txn1* в СЗ. Показатели окислительного повреждения плаценты (TBARS, F2-изопростаны и 8-OHdG) не изменились в течение гестационного возраста независимо от введения дексаметазона, что свидетельствует об адекватной антиоксидантной защите. В целом, эти данные свидетельствуют о том, что плацента крысы защищена от окислительного стресса динамической зональной и стадийно-зависимой экспрессией генов антиоксидантной защиты.

Бронсон и Бэйл (Bronson, Bale, 2016) считают, что плацента играет решающую роль в пагубном и специфическом для пола воздействии материнского стресса и других воздействий на плод. Вызванные стрессом пертурбации внутриутробной среды передаются эмбриону через плаценту, которая отвечает за поддержание внутриматочного гомеостаза. Нарушение жизненно важных функций плаценты может оказать значительное влия-

ние на развитие плода (в том числе его головного мозга), результаты этого влияния в значительной степени зависят от пола. По данным некоторых исследователей, сами плаценты, принадлежащие плодам мужского пола, больше подвержены негативным изменениям в случае стрессирования беременных животных (Gallou-Kabani et al., 2010; Chen et al., 2013). Эти негативные воздействия на плод являются значимым фактором риска для предрасположенности к нервно-психическим заболеваниям. Бронсон и Бэйл (Bronson, Bale, 2016) полагают, что потенциальная роль плаценты как механизма передачи сигналов материнского стресса и его последствий для определения риска неврологических и психоневрологических заболеваний огромна.

В обзоре (Rudov et al., 2014) приводятся обширные данные о значении микроРНК в функциях плаценты. Авторы классифицируют три группы микроРНК, связанных с развитием плаценты: 1 — кластер микроРНК хромосомы 14 (C14MC) является самым крупным из известных описанных кластеров микроРНК, включающим 52 микроРНК. Он расположен у человека на хромосоме 14q32. Некоторые микроРНК кластера C14MC преимущественно экспрессируются в плаценте. Кроме того, C14MC, по-видимому, играет важную роль в эмбриональном развитии, нейрогенезе и метаболизме РНК; 2 — кластер микроРНК хромосомы 19 (C19MC) содержит 46 микроРНК, расположенных в хромосоме человека 19q13.41. C19MC экспрессируется только из унаследованной от отца хромосомы и в основном связан с плацентой. Таким образом, C19MC может быть связан с эмбриональным развитием человека; 3 — кластер микроРНК-371-3 состоит из hsa-микроРНК-371a-3p, hsa-микроРНК-371b-3p, hsa-микроРНК-371-5p, hsa-микроРНК-372, hsa-микроРНК-373-3p и hsa-микроРНК-373-5p. Этот кластер примыкает к кластеру C19MC и, как известно, экспрессируется в плаценте. В частности, микроРНК этого кластера высоко экспрессируются в эмбрионах человека. Кластер микроРНК-371-3, по-видимому, регулирует клеточный цикл, пролиферацию и апоптоз.

Недавние исследования показали, что некоторые микроРНК влияют на развитие плаценты. Пролиферация трофобластов может быть стимулирована микроРНК-378a-5p, микроРНК-376с и микроРНК-14, в то время как микроРНК-155 и микроРНК-675, как было показано, ингибируют пролиферацию клеток трофобласта. МикроРНК-29b индуцирует, а микроРНК-182 ингибирует апоптоз в клетках трофобласта, микроРНК-195, микроРНК-376с и микроРНК-378a-5p усиливают, а микроРНК-210, микроРНК-34а и микроРНК-29b ингибируют миграцию и инвазию трофобластов (Rudov et al., 2014). МикроРНК, которые ранее связывали с различными

плацентарными изменениями, были ассоциированы с АФК и ОС при различных экспериментальных условиях. Было установлено, что микроРНК-210 появляются в результате активации HIF1- α и модулируют адаптивные механизмы, регулирующие окислительный метаболизм, ОС, митохондриальный метаболизм, ангиогенез, ДНК-репарацию и выживание клеток. МикроРНК-144 связана с модуляцией ОС, осуществляемой с помощью регулирования Nrf2 — центрального регулятора клеточного ответа на ОС.

Филлипс с соавт. (Phillips et al., 2017) предлагают разработать методы лечения последствий пренатального стресса, связанных с риском психических заболеваний, направленные на плаценту, а не на плод. Этими исследователями были проведены эксперименты по определению влияния митохондриально-таргетированного антиоксиданта MitoQ, где маркером положительных изменений были измененные микроРНК. Гестационная гипоксия была причиной низкой массы тела при рождении и изменений в мозге молодого взрослого потомства крыс, имитирующих те, что наблюдаются у человека с нервно-психическими заболеваниями. В тканях и плазме родившихся крысят и их плацентах содержались измененные микроРНК, мишени которых были связаны с изменениями экспрессии генов в головном мозге плода и с локусами шизофрении человека. Молекулярные и морфологические изменения *in vivo* и *in vitro* были предотвращены однократной дозой MitoQ, связанного с наночастицами, что локализовало и предотвратило ОС в плаценте, но не в плоде. Другие исследователи (Aljunaidy et al., 2018) также считают, что опосредованная наночастицами доставка митохондриального антиоксиданта к плаценте является потенциально новым подходом, который поможет избежать нежелательных побочных эффектов у развивающегося потомства.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В РЕАЛИЗАЦИИ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА

Редокс-равновесие оказывает значительное влияние на широкий спектр биологических и молекулярных процессов. Когда баланс смещается в сторону повышенного количества свободных радикалов, могут возникать патологические явления, вызванные появлением АФК в тканевом микроокружении или в системном кровообращении. Эпидемия хронических заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, ожирение и диабет коррелируют с дисбалансом окислительно-восстановительного гомеостаза. Современные достижения эпигенетики выявили параллельный сценарий, демонстрирующий влияние ОС на эпигенетическую регуляцию генов через

модификацию метилирования ДНК, гистонов и микроРНК.

Как известно, эмбрион нуждается в энергии в виде АТФ и НАДФН, чтобы развиваться адекватно. Эти соединения образуются в митохондриальных цепях переноса электронов с участием кислорода, где образование побочных АФК, выполняющих сигнальные функции, жестко регулируется. Генерация АФК под контролем нормально сбалансированных механизмов антиоксидантной защиты клетки имеет важное физиологическое значение, как у эмбриона, так и у плода. Следует отметить, что АФК, генерируемые различными внутриутробными состояниями, могут быть одним из ключевых нисходящих медиаторов, инициирующих эпигенетические процессы и изменение программы развития потомства. Предродовая гипоксия, дефицит/избыток питательных веществ и/или глюкокортикоидов — воздействие каждого из этих факторов способно генерировать чрезмерное количество АФК разными механизмами. Орган-специфический ответ зависит от относительного баланса между генерацией АФК и антиоксидантными способностями клетки (Denperry, 2010; Thompson, Al-Hasan, 2012).

Учитывая ту роль, которую белки теплового шока (БТШ) играют в защите клеток в условиях стресса, неудивительно, что между ОС и системой белков теплового шока существует связь. Связанная с ОС система БТШ, возможно, служит и как противовес патологическим механизмам пренатального стресса. БТШ связаны с окислительно-восстановительным равновесием, в том числе с защитой клетки от повреждений, вызванных неправильным фолдингом белков, связанным с окислительной модификацией полипептидной цепи. Активация БТШ осуществляется с помощью различных механизмов, как прямых, таких как индукция теплового шока или обработка активными электрофильными соединениями, так и непрямых, заключающихся в транскрипционной регуляции через элементы антиоксидантного ответа ARE и Nrf2. Животные модели пренатального стресса также продемонстрировали изменения в плацентарной продукции IGF-1 и IGF-2, которые имеют решающее значение как регуляторы роста и формирования нервной системы плода. В дополнение к роли в регулировании роста плода, сигнализация IGF также задействована в регулировании экспрессии БТШ через mTOR-опосредованный механизм. Интересно отметить, что дисрегуляция как систем БТШ, так и окислительно-восстановительных процессов может способствовать нервным и психиатрическим заболеваниям (Dowell et al., 2019).

В различных таксонах позвоночных стрессовые условия окружающей среды во время развития могут формировать фенотипические призна-

ки траектории развития индивидов, которые, будучи адаптивными в краткосрочной перспективе, могут ухудшить здоровье и выживание во взрослой жизни, причем формирование этих фенотипических признаков зависит от пола. Как показали наши исследования, под воздействием пренатального стресса изменяется онтогенетический профиль свободнорадикального окисления белков в структурах мозга крыс, отвечающих за выбор оптимального пути саморегуляции в ответ на стрессорные воздействия. Динамика свободнорадикального окисления белков в гиппокампе, гипоталамусе и стриатуме (Вьюшина и др., 2012a) в постнатальном онтогенезе резко отличается у пренатально стрессированных крыс, что особенно выражено в начальный период постнатального онтогенеза, а именно в период интенсивной миелинизации. Так, в возрасте 10 дней в исследованных структурах базальная окислительная модификация белков у пренатально стрессированных крыс выше, а индуцированная реакцией Фентона — ниже, чем у контрольных сверстников. В то же время в возрасте 20 дней происходит инверсия этих показателей. Это свидетельствует о нарушении процессов метаболизма белков и процессов сигнальной трансдукции, связанных с АФК и окислительной модификацией белков. В возрасте 30 дней между пренатально стрессированными и контрольными животными различия в этих показателях отсутствуют. Однако в возрасте 100 дней наблюдается значительное снижение уровня окислительной модификации белков, как базальной, так и индуцированной, что может свидетельствовать как об общем снижении оксидативных процессов, так и об изменении системы про-и антиоксидантов в целом.

При сравнении параметров контрольных и пренатально стрессированных животных в возрасте 10 и 20 дней можно сделать вывод о более ранней дифференцировке мозга и сокращении сроков морфогенеза. Этот процесс весьма неблагоприятен для дальнейшего развития исследованных структур мозга. Сокращение сроков и ранняя остановка морфогенеза свидетельствуют об изменении сроков развития, что в свою очередь может повлечь за собой раннее старение (Корочкин, Михайлов, 2000). Исследования, проведенные, в том числе и в нашей лаборатории (Шамолина и др., 2009; Vallée et al., 1999) показывают, что пренатальный стресс ускоряет процессы возрастной дисфункции ГАС и репродуктивной системы. Когнитивные расстройства у таких животных начинаются раньше, чем у контрольных сверстников. Можно предположить, что это следствие ускоренного старения структур мозга. Очевидно, что долгосрочные преимущества или издержки стресса в раннем возрасте, скорее всего, будут зависеть от условий, испытываемых на разных стадиях развития.

Стресс в раннем возрасте может вызывать долгосрочные изменения в антиоксидантной защите (Marasco et al., 2013). Величина этих эффектов зависела от времени воздействия глюкокортикоидов и от взаимодействия между пре- и постнатальными стрессовыми стимулами. Авторы обнаружили различия в реакции на воздействие глюкокортикоидов у клеток с более сильной антиоксидантной защитой (эритроциты) и у тканей мозга, где уровень антиоксидантной защиты более низкий. Длительные эффекты влияния глюкокортикоидов в мозге на антиоксидантные биомаркеры оказались регионспецифичными.

Нами были проведены исследования, в которых оценивалось влияние пренатального стресса на активность антиоксидантных ферментов в неокортексе и сыворотке крови. Пренатальный стресс вызывал снижение активности СОД в сыворотке крови (Вьюшина и др., 2012б) и нейронах неокортекса (Флёров и др., 2008). Изменения активности антиоксидантных глутатионсвязанных ферментов в клетках нейронов и нейроглии неокортекса различаются в субклеточных фракциях этих клеточных популяций (Вьюшина и др., 2020). Так, в ядерной фракции активность глутатионпероксидазы повышается как в нейронах, так и в нейроглии относительно значений контрольной группы. В тоже время пренатальный стресс вызывает изменение активности глутатионпероксидазы, которое разнонаправлено в цитозоле (снижается) и в митохондриях (повышается) нейронов. Кроме того, в нейронах пренатально стрессированных крыс повышается уровень активности глутатионредуктазы в ядерной фракции и уровень активности глутатионтрансферазы в митохондриях. В нейроглии активность ферментов глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы не изменяется у пренатально стрессированных крыс по сравнению с контролем. Следует отметить, что изменение активности глутатионпероксидазы в цитозольной и митохондриальной субклеточных фракциях нейронов и нейроглии также разнонаправлено (Вьюшина и др., 2020).

По-видимому, долгосрочные сдвиги в базальной антиоксидантной защите могут приводить к ускоренным процессам старения, что может формировать эффекты, индуцированные пренатальным воздействием повышенного уровня глюкокортикоидов, вызванного стрессом.

В работе (Bittle, Stevens, 2018) было исследовано влияние антиоксиданта N-ацетилцистеина на формирование микроглии после пренатального стресса. Были исследованы две группы беременных крыс — не стрессированная с добавлением N-ацетилцистеина в питьевую воду и пренатально стрессированная, также с добавлением N-ацетилцистеина в питьевую воду. Анализировались гистологические и цитологические эффекты воз-

действия N-ацетилцистеина у потомства этих крыс. Биттл и Стивенс (Bittle, Stevens, 2018) делают вывод о положительном влиянии N-ацетилцистеина на пренатально стрессированную группу потомства и делают вывод, что окислительно-восстановительную дисрегуляцию можно рассматривать как механизм пренатального стресса.

ОС, активация микроглии и воспаление — это три тесно связанных механизма, связанных с пренатальным воздействием этанола, которые возникают в качестве причинного фактора развития аномалий в микроглии (Akhtar et al., 2017). Гомеостаз глутатиона (GSH) в микроглии имеет решающее значение для восстановления ее противовоспалительных свойств. Поддержание гомеостаза GSH важно не только для редокс-равновесия в развивающемся мозге плода, но столь же критично для усиления м2-подобного фенотипа микроглии, подавляя тем самым воспалительные реакции, вызванные стрессорами окружающей среды.

Следует отметить, что роль GSH заключается не только в функционировании его как антиоксиданта (Hansen, Harris, 2015). В настоящее время GSH признан молекулой, которая участвует в нескольких молекулярных процессах, таких, как активация ферментов и свертывание белков и в более широком смысле — клеточная пролиферация, дифференцировка и апоптоз. GSH, вероятно, находится в связи с редокс-регуляцией в эмбриогенезе, органогенезе и дисморфогенезе. Сдвиги в соотношении GSH/окисленного глутатиона (GSSG) вызывают увеличение S-глутатионилирования белков, что приводит к изменению их активности. Таким образом, сдвиги окислительно-восстановительного потенциала могут воздействовать на изменение функции белка в более длительном периоде. Глутатионовая регуляция редокс-чувствительных событий является одной из главных во время эмбрионального развития.

Клеточный окислительно-восстановительный баланс имеет ключевое значение в функциональной активности клеток, однако этот баланс может быть нарушен. На экспериментальном объекте — развивающемся эмбрионе *Danio rerio* (Timme-Laragy et al., 2013) показано, что концентрации GSH определяются дискретными окнами развития: первичный органогенез, дифференцировка органов и личиночный рост. Онтогенетические изменения в экспрессии генов, связанных с GSH, подтверждают гипотезу о том, что окислительно-восстановительное состояние GSH жестко регулируется на ранних стадиях развития.

В работе (Agarwal et al., 2005) было высказано предположение, что ОС модулирует возрастное снижение фертильности. По-видимому, ОС играет определенную роль во время беременности и нормальных родов, а также в начале преждевременных родов. Окислительный статус клетки моду-

лирует ангиогенез, который имеет решающее значение для роста фолликулов, формирования желтого тела, дифференцировки эндометрия и эмбрионального роста. Переизбыток АФК, возникший в результате нарушения внутриклеточной среды и нарушения обмена веществ, пагубно сказывается на эмбрионе.

Раннее развитие эмбриона у млекопитающих происходит в условиях низкого содержания кислорода. При меньших концентрациях кислорода в культуре *in vitro* эмбрионов свиней уменьшилось содержание H_2O_2 , что привело к снижению уровня фрагментации ДНК, тем самым улучшив развитие. При более высоких концентрациях кислорода (20%) наблюдалось ухудшение дифференцировки, тогда как ускоренное развитие наблюдалось при низких (5%) концентрациях кислорода (Kitagawa et al., 2004).

ОС при беременности и в патогенезе распространенных нарушений у новорожденных может рассматриваться (Marseglia et al., 2014) как компонент раннего процесса старения. Физиологические беременности, так же как осложненные беременности, представляют собой состояние с повышенным воздействием АФК. Сильная корреляция между окислительным статусом и состоянием матери и новорожденного, показывает, что высокий материнский уровень ОС соответствует еще более высокому уровню окислительного стресса у новорожденного, что является фактором ускоренного старения клеток. При этом младенцы имеют ограниченную защиту от ОС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пrenatalный стресс является неотъемлемым фактором эволюции. Активация эпигенетических процессов повышенным уровнем материнских глюкокортикоидов изменяет жизненный путь новорожденных непредсказуемым образом. По заключению некоторых исследователей, при определенном сочетании генетических и эпигенетических факторов, а также постнатального окружения, воздействие пренатального стресса может иметь и позитивное значение, как для адаптивных способностей индивидуума, так и для вида. Однако сложность заключается в многофакторности и полимодальности влияний пренатального стресса. Воздействия в разные временные точки эмбриогенеза будут иметь разные последствия, которые также вступают друг с другом в динамические взаимодействия. Кроме того, для человеческой популяции представляется особо важным то обстоятельство, что в современных технологических и информационных условиях значительно вырос вклад психосоциального стресса как фактора пренатального стресса. Что еще более тревожно, последствиями такого

стресса исследователи зачастую называют рост психопатологий и нервных заболеваний в последние десятилетия. По мнению современных исследователей, пренатальный стресс, вызывая смещение про- и антиоксидантного равновесия в сторону повышения уровня АФК (то есть способствуя развитию ОС), приводит к эпигенетическим изменениям у развивающегося организма. Кроме того, изменение редокс-равновесия в эмбриогенезе влияет на процессы про- и антиоксидантного равновесия во взрослом организме.

Следует отметить тот факт, что взаимодействие матери и плода происходит через посредство плаценты — сложно устроенного (хотя и временного) метаболически активного органа. И в норме, и в случае пренатального стресса, реакция матери опосредуется плацентой, которая как метаболически активный орган обладает и своей системой активного редокс-баланса, также подвергающегося ОС, эпигенетическим изменениям и своим как положительным, так и крайне негативным воздействием на плод. Таким образом, понимание механизмов ОС, положительных и негативных последствий его дисрегуляции на всех уровнях системы мать—плацента—плод, понимание процессов активации ОС эпигенетических процессов в эмбриогенезе, может помочь в индивидуальной профилактике и терапии последствий пренатального стресса, в частности когнитивных нарушений и психиатрических заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на 2020 год, тема № 0134-2019-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арутюнян А.В., Шестопалов А.В., Буштырева И.О. и др. Биохимические механизмы формирования плаценты при физиологической и осложненной беременности / Ред. Э.К. Айламазян. СПб.: Изд-во ВМА, 2010. 189 с.

- Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г. Ордян Н.Э. Влияние пренатального стресса на активность антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии коры головного мозга крыс // *Нейрохимия*. 2020. Т. 37. № 2. С. 148–152.
- Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флёров М.А. Влияние пренатального стресса на окислительную модификацию белков головного мозга крыс в онтогенезе // *Нейрохимия*. 2012а. Т. 29. № 2. С. 240–246.
- Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флёров М.А. Окислительная модификация белков в структурах мозга крыс линии Спрэг-Дули и некоторые показатели поведения после пренатального стресса // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2012б. Т. 98. № 8. С. 962–969.
- Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. Л.: Наука, 1988. 288 с.
- Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. Введение в нейрогенетику. М.: Наука, 2000. 274 с.
- Ордян Н.Э., Пивина С.Г. Характеристика поведения и стрессореактивности гипофизарно-адренокортикальной системы пренатально стрессированных крыс // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2003. Т. 84. № 1. С. 52–59.
- Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Баранова К.А. и др. Зависимое от пола действие пренатального стресса на активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы крыс: роль кортикостероидных рецепторов мозга // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2020. Т. 106. № 6. С. 740–755.
- Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э. Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты. СПб.: Деятка, 2007. 240 с.
- Пивина С.Г., Ракицкая В.В., Шамолина Т.С., Ордян Н.Э. Изменение морфометрических характеристик матки крыс под действием пренатального стресса // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2010. Т. 96. № 6. С. 621–626.
- Пивина С.Г., Шамолина Т.С., Акулова В.К., Ордян Н.Э. Чувствительность к социальному стрессу у самок крыс с измененной стрессорной реактивностью гипофизарно-адренокортикальной системы // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2007. Т. 93. № 11. С. 1319–1325.
- Резников А.Г., Пищак В.П., Носенко Н.Д. и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы: Медакадемія, 2004. 351 с.
- Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // *Вопросы цитологии и общей физиологии* / Ред. Ю.И. Полянский. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1960. С. 263–285.
- Флёров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В., Притворова А.В. Влияние пренатального стресса на свободно-радикальное окисление липидов и белков и активность супероксиддисмутазы в нейронах и нейроглии коры больших полушарий головного мозга крыс // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2008. Т. 94. № 4. С. 406–413.
- Шаляпина В.Г., Зайченко И.Н., Батуев А.С., Ордян Н.Э. Изменение нейроэндокринной регуляции приспособительного поведения после стресса в позднем пренатальном онтогенезе // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2001. Т. 87. С. 1193–1201.
- Шамолина Т.С., Пивина С.Г., Ордян Н.Э. Изменение активности гипофиз-адренокортикальной и репродуктивной систем пренатально стрессированных самок крыс в процессе старения // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2009. Т. 95. № 9. С. 984–992.
- Шамолина Т.С., Пивина С.Г., Ордян Н.Э. Влияние социальной изоляции в период пубертата на репродуктивные функции и поведение пренатально стрессированных самок крыс // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2010. Т. 96. № 6. С. 598–608.
- Abbott P.W., Gumusoglu S.B., Bittle J. et al. Prenatal stress and genetic risk: how prenatal stress interacts with genetics to alter risk for psychiatric illness // *Psychoneuroendocrinology*. 2018. V. 90. P. 9–21.
- Agarwal A., Gupta S., Sharma R. K. Role of oxidative stress in female reproduction // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005. V. 14. P. 3–28.
- Akhtar F., Rouse C.A., Catano G. et al. Acute maternal oxidant exposure causes susceptibility of the fetal brain to inflammation and oxidative stress // *J. Neuroinflamm.* 2017. V. 14. № 195. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0965-8>
- Aljunaidy M.M., Morton J.S., Kirschenman R. et al. Maternal treatment with a placental-targeted antioxidant (MitoQ) impacts offspring cardiovascular function in a rat model of prenatal hypoxia // *Pharmacol. Res.* 2018. V. 134. P. 332–342.
- Barker D.J., Winter P.D., Osmond C. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease // *Lancet*. 1989. V. 2 (8663). P. 577–580.
- Berghänel A., Heistermann M., Schülke O. et al. Prenatal stress accelerates offspring growth to compensate for reduced maternal investment across mammals // *PNAS USA*. 2017. V. 27. P. E1065. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707152114/-/DCSupplemental>
- Bittle J., Stevens H. The role of glucocorticoid, interleukin-1 β , and antioxidants in prenatal stress effects on embryonic microglia // *J. Neuroinflamm.* 2018. V. 15. № 44. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1079-7>
- Bleker L. S., De Rooij S. R., Roseboom T. J. et al. Programming effects of prenatal stress on neurodevelopment — the pitfall of introducing a self-fulfilling prophecy // *Int. J. Environ. Res. Publ. Health*. 2019. V. 16. Iss. 13. № 2301. <https://doi.org/10.3390/ijerph16132301>
- Boersma G.J., Tamashiro K.L. Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents // *Neurobiol. Stress*. 2015. V. 1. P. 100–108.
- Bolten M., Nast I., Skrzundz M. et al. Prenatal programming of emotion regulation: neonatal reactivity as a differential susceptibility factor moderating the outcome of prenatal cortisol levels // *J. Psych. Res.* 2013. V. 75. P. 351–357.
- Boyce W.T., Ellis B.J. Biological sensitivity to context: I. An evolutionary—developmental theory of the origins and functions of stress reactivity // *Dev. Psychopathol.* 2005. V. 17. Iss. 2. <https://doi.org/10.1017/S0954579405050145>

- Braithwaite E.C., Pickles A., Sharp H. et al.* Maternal prenatal cortisol predicts infant negative emotionality in a sex-dependent manner // *Physiol. Behav.* 2017. V. 175. P. 31–36.
- Bronson S.L., Bale T.L.* The placenta as a mediator of stress effects on neurodevelopmental reprogramming // *Neuropsychopharmacology*. 2016. V. 41. P. 207–218.
- Brunner A.M., Nanni P., Mansuy I.M.* Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines // *Epigen. Chrom.* 2014. V. 7. № 2. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-2>
- Cao-Lei L., de Rooij S.R., King S. et al.* Prenatal stress and epigenetics // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020. V. 117. P. 198–210. Epub. 2017. May 18. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.016>
- Chen P-Y., Ganguly A., Rubbi L. et al.* Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression // *Physiol. Genom.* 2013. 15. V. 45 (14). P. 565–576. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00034.2013>
- Conradt E., Adkins D.E., Crowell S.E. et al.* Incorporating epigenetic mechanisms to advance fetal programming theories // *Dev. Psychopathol.* 2018. V. 30. Iss. 3. P. 807–824.
- Coussons-Read M.E.* Effects of prenatal stress on pregnancy and human development: mechanisms and pathways // *Obstet. Med.* 2013. V. 6. P. 52–57.
- Darnaudéry M., Maccari S.* Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress // *Brain Res. Rev.* 2008. V. 57 (2). P. 571–585. Epub. 2007. Nov. 28. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.11.004>
- Davis E.P., Glynn L.M., Waffarn F. et al.* Prenatal maternal stress programs infant stress regulation // *J. Child Psychol. Psych.* 2011. V. 52. Iss. 2. P. 119–129.
- Del Giudice M., Ellis B.J., Shirtcliff E.A.* The adaptive calibration model of stress responsivity // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2011. V. 35. P. 1562–1592. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.11.007>
- Dennery P.A.* Oxidative stress in development: nature or nurture? // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. V. 49. P. 1147–1151.
- Dowell J., Elser B.A., Schroeder R.E. et al.* Cellular stress mechanisms of prenatal maternal stress: heat shock factors and oxidative stress // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 709. № 14. Article 134368. Epub. 2019. Jul. 9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134368>
- Essex M.J., Boyce W.T., Hertzman C. et al.* Epigenetic vestiges of early developmental adversity: childhood stress exposure and DNA methylation in adolescence // *Child Dev.* 2013. V. 84. Iss. 1. P. 58–75. Epub. 2011. Sep. 2. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2011.01641.x>
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N.* Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 102–114.
- Gallou-Kabani C., Gabory A., Tost J. et al.* Sex and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet // *PLoS One*. 2010. V. 5. Iss. 12. P. e14398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014398>
- Gluckman P.D., Hanson M.A.* Living with the past: evolution, development, and patterns of disease // *Science*. 2004. V. 305. Iss. 5691. P. 1733–1736.
- Graignic-Philippe R., Dayana J., Chokronb S. et al.* Effects of prenatal stress on fetal and child development: a critical literature review // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014. V. 43. P. 137–162.
- Gur T.L., Palkar A.V., Rajaseker T. et al.* Prenatal stress disrupts social behavior, cortical neurobiology and commensal microbes in adult male offspring // *Behav. Brain Res.* 2019. V. 1. Iss. 359. P. 886–894.
- Guzman C., Cabrera R., Cardenas M. et al.* Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny // *J. Physiol.* 2006. V. 572. Iss. 1. P. 97–108.
- Hansen J.M., Harris C.* Glutathione during embryonic development // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1850. P. 1527–1542.
- Howland M.A., Sandman C.A., Glynn L.M. et al.* Fetal exposure to placental corticotropin-releasing hormone is associated with child self-reported internalizing symptoms // *Psychoneuroendocrinology*. 2016. V. 67. P. 10–17.
- Jones M.L., Mark P.J., Lewis J.L. et al.* Antioxidant defenses in the rat placenta in late gestation: increased labyrinthine expression of superoxide dismutases, glutathione peroxidase 3, and uncoupling protein 21 // *Biol. Reprod.* 2010. V. 83. P. 254–260.
- Kim D.R., Bale T.L., Epperson C.N.* Prenatal programming of mental illness: current understanding of relationship and mechanisms // *Curr. Psych. Rep.* 2015. V. 17. Iss. 2. P. 5. <https://doi.org/10.1007/s11920-014-0546-9>
- Kitagawa Y., Suzuki K., Yoneda A. et al.* Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos // *Theriogenology*. 2004. V. 62. Iss. 7. P. 1186–1197.
- Krontira A.C., Cruceanu C., Binder E.B.* Glucocorticoids as mediators of adverse outcomes of prenatal stress // *Trends Neurosci.* 2020. V. 43. Iss. 6. P. 394–405.
- Marasco V., Spencer K.A., Robinson J. et al.* Developmental post-natal stress can alter the effects of pre-natal stress on the adult redox balance // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013. V. 191. P. 239–246.
- Mark P.J., Augustus S., Lewis J.L. et al.* Changes in the placental glucocorticoid barrier during rat pregnancy: impact on placental corticosterone levels and regulation by progesterone // *Biol. Reprod.* 2009. V. 80. P. 1209–1215.
- Marseglia L., D'Angelo G., Manti S.* Oxidative stress-mediated aging during the fetal and perinatal periods // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. Article ID 358375. 8 p. <https://doi.org/10.1155/2014/358375>
- Mattern F., Post A., Solger F. et al.* Prenatal and postnatal experiences associated with epigenetic changes in the adult mouse brain // *Behav. Brain Res.* 2019. V. 359. P. 143–148.
- McGowan P.O., Matthews S.G.* Prenatal stress, glucocorticoids, and developmental programming of the stress response // *Endocrinology*. 2018. V. 159. P. 69–82.
- Monaghan P., Haussmann M.F.* The positive and negative consequences of stressors during early life // *Earl. Hum. Develop.* 2015. V. 91. P. 643–647.

- Monk C., Spicer J., Champagne F.A. Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: the role of epigenetic pathways // *Dev. Psychopathol.* 2012. V. 24. Iss. 4. P. 1361–1376.
- Murgatroyd C., Quinn J.P., Sharp H.M. et al. Effects of prenatal and postnatal depression, and maternal stroking, at the glucocorticoid receptor gene // *Transl. Psychiatry.* 2015. № 5. P. e560.
<https://doi.org/10.1038/tp.2014.140>
- Nelson M.M., Evans H.M. Maintenance of pregnancy in the absence of dietary protein with estrone and progesterone // *Endocrinology.* 1954. V. 55. Iss. 5. P. 543–549.
- Nugent B.M., Bale T.L. The omniscient placenta: metabolic and epigenetic regulation of fetal programming // *Front. Neuroendocrinol.* 2015. № 39. P. 28–37.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.09.001>
- Pena J., Monk C., Champagne F.A. Epigenetic effects of prenatal stress on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain // *PLoS One.* 2012. V. 7. Iss. 6. P. e39791.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039791>
- Provençal N., Binder E.B. The effects of early life stress on the epigenome: from the womb to adulthood and even before // *Experim. Neurol.* 2015. V. 268. P. 10–20.
- Phillips T.J., Scott H., Menassa D.A. et al. Treating the placenta to prevent adverse effects of gestational hypoxia on fetal brain development // *Sci. Rep.* 2017. V. 7 (1). P. 9079.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06300-1>
- Richetto J., Riva M.A. Prenatal maternal factors in the development of cognitive impairments in the offspring // *J. Reprod. Immunol.* 2014. V. 104. Iss. 105. P. 20–50.
- Rudov A., Balduini W., Carloni S. et al. Involvement of miRNAs in placental alterations mediated by oxidative stress // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. Article ID 103068. 7 p.
<https://doi.org/10.1155/2014/103068>
- St-Cyr S., McGowan P.O. Adaptation or pathology? The role of prenatal stressor type and intensity in the developmental programming of adult phenotype // *Neurotoxicol. Teratol.* 2018. V. 66. P. 113–124.
- Stöhr T., Wermeling D.S., Szuran T. et al. Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998. V. 59. № 4. P. 799–805.
- Thompson L.P., Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming // *J. Pregnancy.* 2012. Article ID 582748. 8 p.
<https://doi.org/10.1155/2012/582748>
- Timme-Laragy A.R., Goldstone J.V., Imhoff B.R. et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 89–101.
- Vallée M., Maccari S., Dellu F. et al. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat // *Eur. J. Neurosci.* 1999. V. 11. № 8. P. 2906–2916.
- van den Bergh B.R.H., van den Heuvel M.I., Lahti M. et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: the influence of maternal stress in pregnancy // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2020. V. 117. P. 26–64. Epub. 2017. Jul. 28.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.003>
- Weinstock M. The long-term behavioral consequences of prenatal stress // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008. V. 32. Iss. 6. P. 1073–1086.
- Wu F., Tian F.-J., Lin Y., Xu W.-M. Oxidative stress: placenta function and dysfunction // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016. V. 76. P. 258–271.
- Zhou H., Hu H., Lai M. Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms // *Biol. Cell.* 2010. V. 102. P. 645–655.

Some Aspects of the Current State of Prenatal Stress and the Role of Oxidative Stress in the Realisation of Its Consequences

A. V. Vyushina^{a,*} and N. E. Ordyan^a

^a*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^{*}*e-mail: awwa104@yandex.ru*

Prenatal stress of any etiology is an integral factor in evolution. Activation of epigenetic processes by increased levels of maternal glucocorticoids changes the life path of newborns in unpredictable ways. Different stressors at different time points of embryogenesis will have different consequences, which also enter into dynamic interactions with each other. One of the dramatic results of such interacting processes is the growth of psychopathologies and nervous diseases. An increase in the level of maternal glucocorticoids causes a disruption of the redox balance in the fetus, and as a result — oxidative stress, that is, the process of shifting the pro- and antioxidant balance in the direction of increasing the formation of reactive oxygen species. Some epigenetic changes that may cause disorders of the central nervous system are the result of oxidative stress. In addition, normally and in the case of stress, the mother's reaction is mediated by the placenta, which, as a metabolically active organ, also has its own system of redox balance, which is also subjected to oxidative stress. Placental epigenetic changes have both positive and negative effects on the fetus. The review examines recent research on the complex analysis of the multicomponent problem of the causes and consequences of prenatal stress.

Keywords: prenatal stress, psychopathology, epigenetics, oxidative stress, placenta

УДК 615.918+615.099.092

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ТОКСИНАХ ВЫСШИХ ГРИБОВ: ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

© 2021 г. А. А. Ховпачев^{1, *}, В. А. Башарин¹, С. В. Чепур^{2, **}, С. В. Волобуев^{3, ***}, М. А. Юдин²,
А. С. Гоголевский², А. С. Никифоров², Л. Б. Калинина³, М. А. Тюнин²

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

²Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины,
Санкт-Петербург, Россия

³Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: vtmz@vmeda.org

**e-mail: gniiivm_2@mil.ru

***e-mail: rbo.fungi@binran.ru

Поступила в редакцию 27.07.2020 г.

После доработки 09.08.2020 г.

Принята к публикации 10.08.2020 г.

В продолжение обсуждения токсинов высших грибов рассмотрены их ядовитые высокомолекулярные белки. Токсины подобного строения актуальны для исследований как соединения, способные приводить к интоксикациям у человека. Их используют как инструменты в биотехнологии, а также изучают в качестве перспективных лекарственных средств. Однако, с точки зрения токсикологии, ядовитые белки макромицетов охарактеризованы в недостаточной степени. Согласно общим представлениям о токсинах, рассмотрены их функции и основные принципы строения. Проанализированы механизмы действия, реализуемые перфорины, аминоксидазами, рибонуклеазами, активаторами вторичных мессенджеров, иммунотоксинами и ядовитыми протеазами макромицетов. Обобщены некоторые данные об их каталитической активности. На примерах эгеролизина, перфоринов мухоморов, вольватоксина, лектина VVL, болесатина раскрыты современные представления о реализации ими токсического процесса на уровнях от молекулярного до организменного. Сделан вывод о том, что дальнейшее изучение распределения высокомолекулярных белковых токсинов позволит приблизить осмысление их биологической роли в плодовых телах макромицетов, а исследование более детальных механизмов токсического процесса — их систематизировать.

Ключевые слова: высшие грибы, токсины, белки, перфорины, аминоксидазы, ингибиторы синтеза белка, иммунотоксины, протеазы, отравления

DOI: 10.31857/S0042132421010208

ВВЕДЕНИЕ

Высшие грибы — значимый источник биологически активных высокомолекулярных белков, изучение которых актуально по причине возможного применения в качестве новых медицинских препаратов и мощных исследовательских инструментов (Вассер, 2015). В течение последнего десятилетия их исследования продвинулись за счет попыток упорядочить геномы важных, с точки зрения биотехнологии, фармакологии и медицины, видов макромицетов. Применительно к человеку на клеточном и тканевом уровне эффекты белков рассматривают в рамках антипролиферативного, цитостатического, иммуномодулирующего и тромболитического действия, в отношении других организмов — антибактериального, антипротозойного, нематоцидного, антифунги-

нального и инсектицидного (Кудрявцева и др., 2008; Белова, 2018; Xu et al., 2011; Hassan et al., 2015; Sabotič et al., 2015; Olombrada et al., 2017; Novak et al., 2020). Исследование механизмов их действия представляет существенный элемент оценки рисков для здоровья человека в ходе фармакологического применения препаратов на их основе (Белова, 2018; Магазов и др., 2019). В то же время часть из них, ввиду выраженности биологического эффекта, подлежит непосредственному изучению в рамках токсикологии.

Высокомолекулярные белки макромицетов могут обуславливать пищевые интоксикации, или микетизмы, поэтому они значимы еще и с клинической точки зрения (Kretz et al., 1991b; Landi et al., 2017). Микетизмы подобного рода сопряжены с трудной дифференциальной диагно-

стикой и невысокой частотой лабораторно подтвержденных случаев (White et al., 2019). Это связано как с неустойчивостью белковых токсинов, так и низкой корреляцией между биологической активностью и клиническими проявлениями интоксикаций в условиях их алиментарного попадания в организм. Подобная закономерность характерна для токсического процесса, оказываемого многими пассивно-ядовитыми животными и растениями, у которых отсутствует аппарат доставки токсинов (Guidebook to protein..., 1997; Yao et al., 1998; Berry, Crickmore, 2017). Кроме этого, способность к продукции ядовитых протеинов также встречаются и за пределами токсикологически значимых грибов (Odenthal et al., 1982; Žužek et al., 2006). Так, среди культивируемых с пищевыми целями макромицетов встречаются белки, эквивалентные по уровню внутривенной токсичности для млекопитающих аманитотоксинам (Hassan et al., 2015).

В целом, белковые токсины высших грибов как регуляторные элементы, способные в малых концентрациях приводить к критическому сдвигу регуляции и гибели биологических систем вне их контроля, часто подпадают под узкое медицинское толкование (Магазов и др., 2019; Nayak et al., 2013). Вместе с тем, в сравнении с подобными соединениями других природных источников, им уделяют гораздо меньшее внимание (Белова, 2018; Landi et al., 2017). Несмотря на довольно длительный период, истекший с начала изучения белковых токсинов макромицетов — первые исследования агглютинирующих и лизирующих эритроциты фракций в составе плодовых тел, причисленных к родам *Amanita* Pers., *Entoloma* P. Kumm., *Lactarius* Pers. и *Inocybe* (Fr.) Fr., относят к 1907 и 1911 гг. — по настоящий момент нет их единого понимания, а вследствие этого и классификации (Ford, 1911). Это требует от биологов, фармакологов и врачей дальнейшего углубления знаний о них (Вассер, 2015; Wong et al., 2020). В связи с этим в продолжение обсуждения токсинов высших грибов предпринята попытка обобщения современных сведений об их структурной организации, механизмах действия и биологическом разнообразии продуцентов.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВЫХ ТОКСИНОВ МАКРОМИЦЕТОВ

Функции и общие принципы молекулярной организации

В настоящий момент классификация токсинов белковой структуры макромицетов отсутствует. Тем не менее, представляя лишь часть общего в рамках токсинологии, ядовитые свойства их белков не уникальны в концепции своего развития.

В ходе обсуждения это позволяет сравнивать рассматриваемые соединения с аналогичными среди других царств живых организмов, тем самым восполняя пробелы их понимания и осмысления в качестве индивидуальных представителей различных классов токсинов.

С точки зрения фитофармакологии, по соотношениям структура—активность среди белков макромицетов принято выделять лектины, перфорины, грибные иммуномодулирующие белки, ингибиторы синтеза белка и лакказы (Xu et al., 2011). Применительно к токсинологии эти соотношения во многом дублируют представления о бактериальных токсинах (Schmitt et al., 1999), среди которых выделяют по механизмам действия пять основных типов: повреждающие мембрану, ингибиторы синтеза белка, активаторы вторичных мессенджеров, активаторы иммунной системы и протеазы.

Помимо предложенных к рассмотрению, также известно большое количество токсинов, которые способны рецептор-опосредованно влиять на ЦНС млекопитающих, тем самым детерминируя нарушения функций организма или его гибель (Guidebook to protein..., 1997). В данный момент продуценты подобных белков среди макромицетов не известны. Вместе с тем, среди токсинов высших грибов эту нишу заполняют вещества, способные к имитации эндогенных нейромедиаторов, со структурой простых азотсодержащих соединений и ациклических терпенов, которые, по всей видимости, влияют на свойства биомембран нейронов (White et al., 2019).

Касательно биологических функций, на выполнение которых направлены белковые токсины макромицетов, существует несколько гипотез. С одной стороны, они могут действовать как классические защитные соединения в отношении конкурирующих организмов, а с другой — участвовать в регуляции эндогенных процессов, например в реакциях на абиотический стресс или на процессы развития: активный рост, плодоношение и старение (Кудрявцева и др., 2008; Berry, Crickmore, 2017). Кроме того, рассматривают их роль в качестве антиметаболических и запасных белков, а также факторов ауторегуляции (Lapadula, Ayub, 2017). Вместе с тем известны случаи опосредованных макромицетами инфекционных заболеваний, что позволяет предположить роль их токсинов в качестве патогенетических факторов (Mori et al., 1998).

Структурно токсины макромицетов, как и ядовитые белки микроорганизмов, животных и растений, представляют либо отдельные соединения, либо олигомерные комплексы с несколькими видами активности (Hassan et al., 2015). Считают, что эволюционно образование таких агрегатов возникло благодаря объединению двух или более

функциональных белков. Это принцип организации двух доменов: один участок обладает каталитической активностью, а другой — отвечает за распознавание и доставку в клетку-мишень (Schmitt et al., 1999).

Тропность белковых токсинов определена их связывающим доменом. Среди токсинов грибов эта функция опосредована лектинными участками, а также аффинностью, обусловленной их молекулярными химическими свойствами (Xu et al., 2011). В качестве лектинов рассматривают неиммунные белки или гликопротеины, которые обладают способностью связывать углеводы с высокой степенью селективности, в результате чего *in vitro* возникает явление клеточной агглютинации. Следует отметить, что макромицеты представляют один из основных источников лектинов без прочей биологической активности. В течение последних лет был обнаружен ряд грибных лектинов, биологическую активность которых предстоит изучить (Hassan et al., 2015).

К характерным свойствам высокомолекулярных токсинов белковой структуры в качестве сигнальных молекул относят наличие экранирующего элемента, исключающего их случайное взаимодействие с субстратом в собственной клетке и за пределами мишени. Этот механизм также способствует передаче сигнала на большом расстоянии без ослабления его силы (Guidebook to protein..., 1997). Среди токсинов макромицетов известны механизмы протеолитического расщепления субъединицы-прекурсора и инициирования процесса сборки мономеров в полноценный функциональный комплекс только после их взаимодействия со структурными элементами мишеней.

Токсины, повреждающие мембраны

Среди ядовитых белков высших грибов встречаются два класса токсинов, повреждающих биологические мембраны: перфорины и прооксиданты.

Перфорины PFTs, или порообразующие токсины (pore-forming toxins), оказывают повреждающее действие на плазматические мембраны посредством циклизации в полимерные комплексы, образующие ионные каналы с различной пропускной способностью. На клеточном уровне образование пор приводит к развитию коллоидно-осмотического лизиса, в то время как на уровне целостного организма они оказывают выраженные кардио-, нейро- и пульмонотоксические действия (Современные методы изучения ..., 2020; Gouaux, 1997; Dal Peraro, van der Goot, 2015).

Среди грибов токсичность изолированных перфоринов впервые была показана на примере аспергиллгемолизина оппортунистического патогена *Aspergillus fumigatus* Fresen., среднесмертельные дозы (ЛД₅₀) которого при внутривенном

введении крысам и курицам составляют 0.75 и 0.35 мг/кг соответственно (Henrici, 1939). Начало исследований ядовитых свойств перфоринов среди макромицетов связано с изучением фаллолизинов Мухомора зеленого, или бледной поганки (*Amanita phalloides*), рубесценслизина М. серо-розового (*A. rubescens*) и фасцикуларелизина Ложноопенка серно-желтого (*Hypholoma fasciculare*). Внутривенная токсичность фаллолизинов для мышей составляет ЛД₅₀ = 0.22 мг/кг, а для крыс — ЛД₅₀ = 0.1 мг/кг, ЛД₉₉ = 0.66 мг/кг (Odenthal et al., 1975; Faulstich et al., 1983). Сравнимым уровнем токсичности обладают рубесценслизин, ЛД₅₀ которого при внутривенном введении 0.15 мг/кг (крысы) и 0.31 мг/кг (мыши), и фасцикуларелизин — 0.5 мг/кг (крысы) (Seeger, 1975; Seeger et al., 1981).

На сегодня перфорины идентифицированы, выделены и в различной степени охарактеризованы для ряда макромицетов (табл. 1). Интерес вызывает наличие токсинов подобного рода среди съедобных и культивируемых в пищевых целях видов. Объяснением этого считают относительную термолабильность рассматриваемых перфоринов. Вместе с тем известны эпизодические случаи летальных интоксикаций после приема в пищу в большом количестве или после недостаточной обработки их съедобных продуцентов (Lin et al., 1974; Al-Deen et al., 1987; Jin et al., 2014; White et al., 2019).

Токсины высших грибов с порообразующей активностью принадлежат надсемейству мембран-атакующих перфоринов MACPF (membrane attack complex/perforin). Они представляют мономерные протеины, которые образуют каналы при совместном участии и для которых характерна либо одно-, либо двухкомпонентная система полимеризации (Gouaux, 1997; Nayak et al., 2013). Наличие дополнительной субъединицы в ходе реакции полимеризации для некоторых обязательно, а для других — нет. Последние могут реализовывать свой эффект либо потенцируя друг от друга, либо наоборот — ингибируя. Для ряда перфоринов грибов показано, что их максимальная токсичность возникает при фиксированном соотношении субъединиц разных типов (Faulstich et al., 1983; Lukoyanova et al., 2015). Ингибирующие процесс полимеризации субъединицы, как правило, играют роль неактивного предшественника токсина (Weng et al., 2003; Lin et al., 2004).

Структурно среди известных мембран-атакующих перфоринов грибов в наибольшей степени охарактеризованы белки с эгеролизинным доменом (Pfam: PF06355) (Ota et al., 2013; Frangež et al., 2017). В составе MACPF они входят в семейство холестерин-зависимых цитолизинов CDC (cholesterol-dependent cytolysin), также известных как тиол-активируемые перфорины (Gouaux, 1997;

Таблица 1. Перфорины макромицетов (адаптировано по: Nayak et al., 2013)

Перфорин	Продуцент
Эгеролизин	<i>Cyclocybe aegerita</i> (V. Brig.) Vizzini
Фаллолизины А, В	<i>Amanita phalloides</i> (Vaill. ex Fr.) Link
Рубесценслизин	<i>Amanita rubescens</i> Pers.
Фламмутоксины А, В	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer
Фасцикуларелизин	<i>Hypholoma fasciculare</i> (Huds.) P. Kumm.
Лектин LSL	<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill
Дейтеролизин	<i>Moniliophthora perniciosa</i>
МрPRIA 1, 2	(Stahel) Aime et Phillips-Morab
Эрилизины А, В ₁ , В ₂	<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quél.
Эрингеолизин	<i>Pleurotus nebrodensis</i> (Inzenga) Quél.
Небродеолизин	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.,
Остреолизин А	<i>Pleurotus pulmonarius</i> (Fr.) Quél.
Плевротолизины А, В	<i>Entoloma rhodopolium</i> (Fr.) P. Kumm.
Токсин 40 кДа	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.
Шизолизин	<i>Volvariella volvacea</i> (Bull.) Singer
Вольватоксин А ₂	

Ota et al., 2013). Несмотря на то, что эталонным в составе эгеролизиннов считают ген *Aa-PR11* Опенка тополиного (*C. aegerita* ≡ *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer), впервые подобная последовательность была секвенирована из мицелия *A. fumigatus* (Fernandez Espinar, Labarère, 1997; Jin et al., 2014). В настоящий момент к числу мембран-атакующих перфоринов макромицетов, гомологичных эгеролизину (16.0 кДа), относят небродеолизин (27.0 кДа) (Lv et al., 2009), эрилизины (Ery A = 14.9 кДа, Ery B₁ = 14.5 кДа, Ery B₂ = 37.4 кДа) (Ngai, Ng, 2006), остреолизин А (Oly A = 12.5 кДа) и плевротолизины А, В (Ply A = 14.5 кДа, Ply B = 59.0 кДа) (Ota et al., 2013; Lukyanova et al., 2015), МрPRIA 1, 2 тропического фитопатогена какао Монилиофторы опасной (*M. perniciosa*) (Mondego et al., 2008).

Сходными с эгеролизинами по массе, по электрохимическим и токсикологическим свойствам являются фаллолизины А, В (Pha A = Pha B = 34.0 кДа), рубесценслизин (35.0 кДа), фасцикуларелизин (35.5 кДа), у которых наличие домона PF06355 не описано. Также, несмотря на то, что N-концевые последовательности эрингеолизина (17.0 кДа), присутствующего наравне с эрилизинами в базидиомах Вешенки степной (*P. eryngii*), и дейтеролизина, который вместе с МрPRIA 1, 2 кодирует геном *M. perniciosa*, гомологичны PF06355, их не причисляют к белкам семейства эгеролизиннов (Mondego et al., 2008; Nayak et al., 2013).

Эгеролизины представляют двухкомпонентные системы, для последовательностей которых характерны частые повторы цистеина, аромати-

ческих и кислых остатков. Индивидуальные белки в составе эгеролизиннов стабильны в широком диапазоне pH, однако термолабильны без возможности рефолдинга при температурах более 39°C, их активность подвергнута значительному снижению в присутствии Hg²⁺ в микромолярном диапазоне концентраций (Žužek et al., 2006).

По всей видимости, функциональное значение аминокислотных повторов в составе эгеролизиннов макромицетов отведено реализации аффинитета к клеточным структурам, который наблюдают в пределах семейства бактериальных токсинов с повторяющимися последовательностями RTX (repeats in toxin) (Guidebook to protein..., 1997). Тем не менее, в отличие от грибных эгеролизиннов, для RTX-токсинов: гемолизина кишечной палочки и аденилатциклазы коклюшной палочки, а также семейства инсектицидных токсинов Vip3B *Bacillus thuringiensis* Berliner, — характерны повторы, богатые глицином и аспартамом. Есть мнение, что их аминокислотные последовательности проявляют высокую степень сходства с участками некоторых эквинатоксинов (Ota et al., 2013) и инсектицидных токсинов семейства Cry34/Cry35 *B. thuringiensis* (Berry, Crickmore, 2017; Novak et al., 2020).

Кроме структурного сходства эгеролизиннов с токсинами представителей других царств, определенные параллели присутствуют и в механизмах их токсического действия (Frangéž et al., 2017). Так, остреолизин Oly A и плевротолизины Ply A, B, сопутствующие друг другу в плодовых телах Вешенок обыкновенной (*P. ostreatus*) и легоч-

ной (*P. pulmonarius*), разрабатывают в рамках экологически чистых инсектицидов, но вместе с тем, при внутривенном введении млекопитающим они проявляют выраженные кардиотоксические свойства (Novak et al., 2020).

Самопроизвольная олигомеризация в растворе субъединиц типа A Ply и Oly, которые идентичны на 90%, возможна только в присутствии Ply B. К молекулам-мишеням, запускающим процесс сборки, относят специфический для насекомых сфинголипид церамид-фосфоэтаноламин, а также сфингомиелин и холестерин мембран млекопитающих. Методами комбинированной кристаллографии и криоэлектронной микроскопии показано, что сборка 12–13-кратной поры с внутренним диаметром 8 нм происходит посредством присоединения одной молекулы Ply B к димеру Ply A или Oly A, отражая оптимальное соотношение субъединиц 1 : 2 (рис. 1) (Lukoyanova et al., 2015). При данном соотношении их токсичность составляет: для мышей $LD_{50} = 1.14$ мг/кг внутривенно, для крыс – $LD_{50} = 1.17$ мг/кг, $LD_{99/15 \text{ мин}} = 1.4$ мг/кг внутривенно, в то время как *per os* достигает $LD_{50} = 319$ мг/кг (Al-Deen et al., 1987; Žužek et al., 2006; Rebolj et al., 2007).

Несмотря на высокую внутривенную токсичность перфоринов в составе базидиом, экстраполированная пероральная LD_{50} свежих плодовых тел *P. ostreatus* для человека массой 70 кг составляет около 2.8 кг. При исследовании подострой *per os* токсичности *P. ostreatus* у грызунов наблюдают микроабсцедирование печени, а также других паренхиматозных органов, которое сопровождается инфильтрация воспалительными клеточными элементами. Отмечают амилоидные изменения селезенки, лимфоидную инфильтрацию кишки и фокальные геморрагические включения в легких (Al-Deen et al., 1987).

При парентеральном введении млекопитающим плевротоксины приводят к нарушению координации движений, клонико-тоническим судорогам, далее переходящим в атоническую кому. Подобные наблюдения были сделаны уже в ходе ранних исследований фаллолизина, рубесценсизина и фасцикуларелизина, внесение которых в среду препарата Лангендорфа угнетает сократимость миокарда, в дальнейшем приводя к его остановке в фазе систолы (Lin et al., 1974; Odenthal et al., 1975, 1982; Seeger, Bunsen, 1980). В совокупности с электрокардиографическими данными, эти признаки позволили предположить, что гибель вследствие токсического действия перфоринов наступает вследствие сердечного механизма танатогенеза (Odenhal et al., 1975).

Эгеролизины *P. ostreatus* дозозависимо приводят к гибели эритроцитов, моноцитов, лимфоцитов, тромбоцитов, эндотелия и нейронов человека. Вызываемый токсинами гемолиз сопровождается

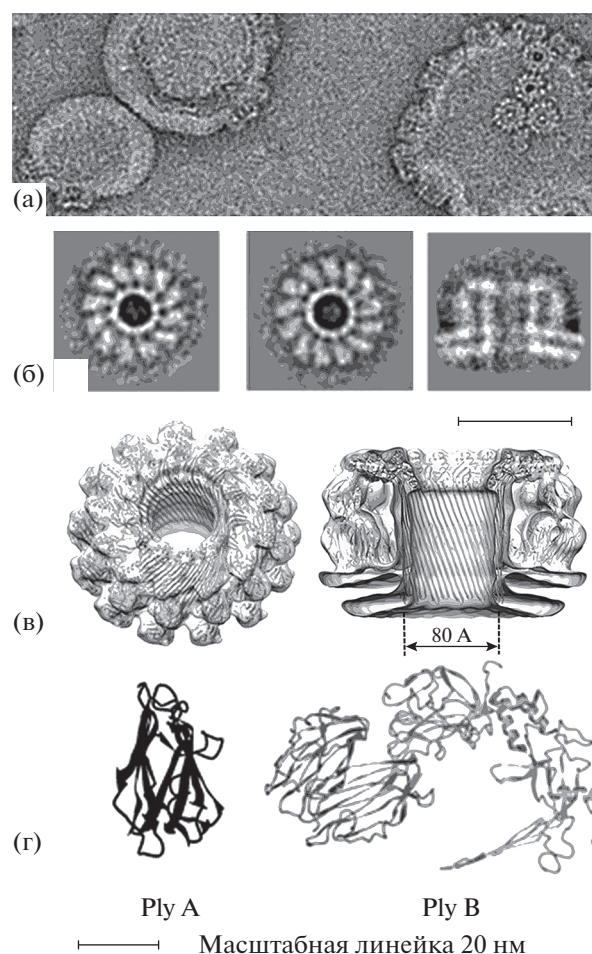


Рис. 1. Плевротоксины: поры на липосомах и структуры мономеров (по: Lukoyanova et al., 2015). (а) — криоэлектронная микрофотография пор на липидных монослоях; (б) — усредненные 12- и 13-мерные поры и их сагитальный вид; (в) — трехмерная реконструкция поры; (г) — трехмерные структуры плевротоксинов А и В.

длительная лаг-фаза, после окончания которой скорость разрушения эритроцитов быстро нарастает, характеризуясь крутой кривой концентрация—отклик (Žužek et al., 2006). Клеточные и субклеточные эффекты оптимальных соотношений перфоринов *P. ostreatus* возникают *in vitro* при следующих концентрациях: 7–14 нмоль/л — порог клеточной утечки Ca^{2+} , 64 нмоль/л — IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) гемолиза эритроцитов, 81.2 нмоль/л — IC_{50} апоптоза фибробластов, 137–250 нмоль/л — IC_{50} апоптоза эндотелиоцитов пуповины, 450 нмоль/л — IC_{50} дегрануляции нейтрофилов, при 700 нмоль/л наблюдают блеббинг нейронов (Rebolj et al., 2007; Juntjes et al., 2009).

Чтобы пережить иницируемый утечкой ионов стресс, пораженные клетки-мишени активируют ряд защитных мер, в том числе провоспа-

лительный каскад (Frangež et al., 2017). Снижение концентрации клеточного калия вызывает активацию стресс- и митоген-активируемых протеинкиназ MAPK (mitogen-activated protein kinase): p38 и внеклеточных сигнально-регулируемых киназ ERK (extracellular signal-regulated kinases). Активация MAPK приводит к высвобождению запасов кальция из эндоплазматического ретикулума, который в дальнейшем также подвержен выходу из клеток через образуемые токсинами поры. Цепь событий воспалительного комплекса включает мобилизацию каспазы 1 и активацию ИЛ-1 (Dal Peraro, van der Goot, 2015); выясняется роль дополнительных путей воспалительного ответа (Bonfini, Buchon, 2016).

Способность к восстановлению целостности плазматической мембраны после нанесенного повреждения и скорость, с которой это происходит, варьируют между типами клеток. Репарация мембран в условиях действия перфоринов может быть опосредована либо эндоцитозом пораженных участков мембраны, либо наоборот, их отпочковыванием по механизму генерации мультивезикулярных тел по пути ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) (Rebolj et al., 2007). Считают, что ESCRT-опосредованная цитоплазматическая экструзия выступает в данных условиях одним из основных механизмов клеточной защиты, который не требует дополнительного синтеза белка, тем самым позволяя своевременно изолировать вызванные перфорином повреждения в режиме низкого расхода энергии (Ota et al., 2013). Так, методами электронной микроскопии показано, что, воздействуя на клетки почечного эпителия линии Madin-Darby, Ply A/Oly A и Ply B индуцируют выработку внутри- и внеклеточных мембранных пузырьков, которые включают в себя как микровезикулы диаметром от 100 нм до 1 мкм, так и более крупные — до 10 мкм. В ходе процесса экструзии наблюдают проникновение за пределы клеток белков, задействованных в реализации пути ESCRT, а также кластерную сортировку холестерина, сфингомиелина и их аддуктов с перфорином *P. ostreatus* на поверхности мембран (Skočaj et al., 2016).

Клеточные эффекты плевротוליзинов опосредуют ряд явлений, изученных на изолированных органах животных. Показано, что остреолизин и плевротוליзины на изолированных препаратах кишки и сердца вызывают мышечный спазм, иногда купируемый папаверином. На электрически стимулированном левом предсердии и на препарате Лангендорфа токсины вызывают сначала кратковременный положительный, а затем отрицательный инотропные эффекты (Juntres et al., 2009; Sabotič et al., 2015). В крови, оттекающей от искусственно перфузируемой печени грызунов после введения в систему перфоринов *P. ostreatus* возникает быстрое повышение кон-

центрации K^+ . Далее, отражая динамику развития цитолиза гепатоцитов, в крови, которая оттекает от органа, нарастает содержание цитоплазматических и митохондриальных ферментов. В перфузируемой почке крыс перфорины также индуцируют массивную протеинурию и снижение ионной реабсорбции (Žužek et al., 2006; Juntres et al., 2009).

Плевротוליзины приводят к специфическим изменениям на электроэнцефалограмме, которые связывают с генерацией пор на мембранных структурах гематоэнцефалического барьера (Frangež et al., 2017). В связи с этим считают, что наблюдаемая в ряде случаев остановка дыхательных движений может быть опосредована их прямым влиянием на дыхательный центр (Žužek et al., 2006). Вместе с тем показано, что у ваготомированных свиней в условиях общей анестезии с искусственной вентиляцией вследствие продленного введения Ply A/Oly A и Ply B возникают спазм и периваскулярный отек коронарных артерий, ведущие к выраженной брадикардии с желудочковыми экстрасистолами. Изменения периферического сосудистого сопротивления в условиях интоксикации носят двухфазный характер, возрастая на начальных этапах и далее переходя в α_1 -резистентную вазоплегию (Juntres et al., 2009). В связи с этим полагают, что дыхательные расстройства по отношению к оказываемому ими ишемическому повреждению миокарда также вторичны и носят рефлекторный характер (Lukoyanova et al., 2015; Vrecl et al., 2015).

Большинство исследователей сходятся во мнении, что непосредственная причина гибели животных вследствие внутривенного введения плевротוליзинов кроется в коронарном вазоспазме, более детальные механизмы которого все еще подлежат уточнению (Frangež et al., 2017). В остром эксперименте на грызунах плевротוליзины приводят к нарастанию концентрации K^+ , значения которой могут превышать референсные показатели в два раза, достигая 10 ммоль/л еще до развития гемолиза (Sabotič et al., 2015). Исследуя реактивность сосудов на плевротOLIзины в условиях обработки различными фармакологическими препаратами, приходят к выводу (Vrecl et al., 2015), что опосредующая коронарный вазоспазм ионная утечка Ca^{2+} может быть дополнительно обусловлена прямой активацией Ca^{2+} -каналов L-типа. ЛД₅₀ плевротOLIзинов также вызывают эффект снижения натяжения сосудов эластического типа (аорта, артерии среднего калибра) на 7–30% (Rebolj et al., 2007). Вместе с тем наблюдаемая в ходе изменений сосудистого комплаенса депрессия диастолического артериального давления ведет к снижению перфузионного давления в коронарном круге кровообращения (Juntres et al., 2009).

За пределами эгеролизинов также известны перфорины грибов, которые содержат гомологичные Cгу- и Cyt-токсинам *B. thuringiensis* участки (Bonfini, Buchon, 2016). Например, трехдоменные вольватоксины Vol A₁ (44.8 кДа) и A₂ (22.4 кДа) Вольвариеллы вольвовой (*V. volvacea*) включают аминокислотную последовательность, на 48% соответствующую δ -эндотоксину CytB (Pfam: PF01338). Токсичность Vol A₂ для грызунов составляет ЛД₅₀ = 1.23 мг/кг при внутривенном и ЛД₅₀ = 40 мг/кг при внутрижелудочном введении, характеризуя его относительную устойчивость к протеолизу в просвете кишки (Lin et al., 2004; Sze et al., 2004). Как и эгеролизины, помимо гемолитической активности, Vol A₂ обладает цито-, кардио- и нейротоксическими эффектами, выраженность которых отличается в связи с различными уровнями аффинности токсинов и особенностями генерируемых ими пор (Nayak et al., 2013).

Процесс образования проходимой для 70 кДа декстрана 18-мерной поры происходит при участии только Vol A₂. Присутствие Vol A₁ ингибирует процесс полимеризации, выполняя роль активируемого после протеолиза предшественника. Активная форма токсина Vol A₂ состоит из С-концевого участка 1–127, задействованного в порообразовании, и N-концевого гепарин-связывающего фрагмента 165–199, который гомологичен лектиновому участку токсина индийской кобры *Naja naja* (L., 1758). Адгезивные свойства гепарин-связывающего фрагмента обеспечивают амфифильные β -нити, а также обнажаемая после протеолиза Vol A₁ α -спираль. Помимо отмены процесса полимеризации посредством гепарина, Vol A₂ характеризует тропность к сульфатированным гликоаминогликанам кардиомиоцитов (Weng et al., 2003; Lin et al., 2004).

Из числа многодоменных перфоринов известен лектин LSL Трутовика серно-желтого (*L. sulphureus*) с молекулярной массой 35 кДа, образующий комплекс из трех связанных между собой каналов-гексамеров с внутренним диаметром 4 нм. Лектин LSL обладает С-концевым порообразующим участком и N-концевым модулем с двумя дисахарид-связывающими сайтами на каждую субъединицу белка (Nayak et al., 2013). В связи с этим токсин характеризуют различные рН-оптимумы по эффектам связывания с мембранами и сборки канала: максимальная скорость взаимодействия с биомембранами возникает при рН = 5–7, в то время как оптимальную активность по гемолитическому эффекту наблюдают при рН = 7–8. В водном растворе рН = 7.4 он находится в динамическом равновесии между мономером и полимером — константа диссоциации Kd = 10⁻⁶ моль/л. Помимо агглютинации N-концевой лектиновый домен LSL оказывает цитотоксическое действие путем связывания поверхностных гликопротеи-

нов и ингибирования их активности. Он обладает гомологическим сходством с подобными сайтами амарантина, абрина, участка HA₁ ботулотоксина А и лектина CEL-III морского огурца *Pseudocnus echinatus* von Marenzeller, 1881 (Mancheño et al., 2005; Hassan et al., 2015).

Ко второму классу грибных токсинов, проявляющих мембранотоксические свойства, относят каталитические белки с L-аминоксидазной активностью в отношении аминокислот. Выявлено, что в составе плодовых тел Мухомора зеленого (*A. phalloides*) свойствами аминоксидазы обладает токсифаллин — токсин с массой 55 кДа, состоящий из 503 аминокислотных остатков, из числа которых приблизительно 7% составляет пролин (Stasyk et al., 2010). Подобный белок, фигурирующий под названием токсовирин, выделен из М. вонючего (*A. virosa* (Fr.) Bertill.) (Antonyuk et al., 2010). Гомологичным токсифаллину считают лектин в составе плодовых тел Лаковицы двухцветной (*Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton) (Martin et al., 2008). Токсины обладают сродством к широкому спектру простых азотсодержащих соединений, продукты окисления которых представляют стабильные радикалы, приводящие к генерации процессов пероксидации липидов. Клеточная гибель вследствие действия токсифаллина и токсовиринна возникает по независимому от активации каскада каспаз пути. Соединения с известной антиоксидантной активностью: аскорбиновая кислота и глутатион — *in vitro* могут полностью отменить опосредованную токсинами конденсацию хроматина и ядерную фрагментацию (Antonyuk et al., 2010; Stasyk et al., 2010).

Содержание токсифаллина в базидиомах *A. phalloides* составляет около 60 мг/кг свежего веса, в то время как концентрация токсовиринна в *A. virosa* менее 10 мг/кг. Оксидативный стресс, оказываемый аминоксидазами в тех количествах, в которых они присутствуют в плодовых телах, носит отсроченный характер и совпадает во временных промежутках с аналогичным действием аманитинов, чей прооксидантный эффект связывают с атомом серы переходной валентности (Zheleva et al., 2007). Вместе с тем уровень биодоступности токсовиринна и токсифаллина в условиях функционирования энтерального барьера, нарушенного основными бициклопептидными токсинами мухоморов секции Phalloideae, не изучен. В связи с этим полагают (Antonyuk et al., 2010), что при потреблении термически необработанных *A. phalloides* и *A. virosa* аминоксидазы могут играть весомую роль в проявлениях фаллоидинового синдрома, в течении которого ведущее значение отводят аманитинам.

Ингибиторы синтеза белка

Среди макромицетов описаны продуценты двух классов рибонуклеаз, которые приводят к нарушению белкового анаболизма посредством необратимой модификации сарцин-рициновой петли 28S рибосомальной РНК (рРНК) большой 60S субъединицы рибосом (Ennamany et al., 1995b; Olombrada et al., 2017). Непосредственная мишень цитотоксических рибонуклеаз — сарцин-рициновая петля SRL (sarcin-ricin loop) — состоит из 14 нуклеотидных оснований, последовательность которых высоко консервативна среди рибосом как эукариот, так некоторых видов прокариот. Она принадлежит к гуанозин-трифосфатазному центру GAC (GTPase associated center) — элементу трансляционного аппарата рибосом, ответственному за управление их непрерывным движением вдоль транслируемого рибонуклеинового полимера. Нарушение работы GAC также ингибирует связывание с рибосомами факторов элонгации EF (elongation factor). Суммарно нарушение этих процессов останавливает биосинтез белка, дефицит продукции которого в конечном итоге приводит к клеточной гибели (Guidebook to protein..., 1997).

Петля получила свое название от риботоксина α -сарцина и рибосом-инактивирующего белка рицина — первых и, как следствие, типовых токсинов среди своих классов. К рибосом-инактивирующим протеинам RIP (ribosome-inactivating protein) относят высокоспецифичные N- β -гликозидазы (КФ 3.2.2.22), нарушающие синтез белка посредством расщепления аминогликозидной связи рибозы с аденином, который локализован в рибосомах гепатоцитов крыс в положении A4324 (Wong et al., 2020). Ферментативное разрушение связи при адениновом основании SRL препятствует функционированию трансляционного механизма посредством блока гидролиза гуанозин-трифосфата.

Каталитический домен RIP-токсинов характеризует консервативная вторичная структура, которая формирует активный сайт, называемый РНК-связывающей расщелиной. К важным аспектам, определяющим уровень цитотоксичности RIP, относят их способность к клеточной пенетрации. В связи с этим выделяют три типа их архитектуры. RIP типа I обычно считают нетоксичными, поскольку они не обладают эффективным доменом связывания клеток или попадания в них. В то же время, наиболее ядовитые RIP II, помимо каталитического центра, содержат лектин-подобный участок. Несмотря на высокое структурное внутригрупповое сходство, биологическая активность токсинов II типа существенно варьирует — в их составе известны нетоксичные рибонуклеазы. В составе растительных токсинов также выделяют III тип RIP, среди которых одна

подгруппа содержит участок с неизвестной ролью, а другая похожа на тип I, но содержит сайт, посредством которого токсин подвержен протеолитической активации (Lapadula, Ayub, 2017).

Селективная депуринизация RIP-токсинами основания A4324 делает смежную с ним фосфодиэфирную связь между гуанином и аденином в положениях G4325 и A4326 более восприимчивой к кислотно-основному и ферментативному гидролизу (Barbieri et al., 1997). Вместе с тем, риботоксины также расщепляют эту фосфодиэфирную связь, однако, уже напрямую. По причине обладания схожей ферментативной активностью, были высказаны предложения об объединении риботоксинов и RIP-токсинов в один класс (Schmitt et al., 1999). Тем не менее, в современном понимании остается представление, что составы классов разграничены по критериям механизмов действия токсинов и консервативных последовательностей их каталитических центров. Эти особенности определяют различную степень их способности к ингибированию синтеза белка и некоторые специфические проявления токсического процесса (Olombrada et al., 2017).

Риботоксины в природе выявлены среди 73 видов живых организмов (Lapadula, Ayub, 2017). Тем не менее, до недавнего времени среди грибов они были известны исключительно для макромицетов отдела Ascomycota (Landi et al., 2017; Ruggieri et al., 2019). К наиболее изученным из их числа относят риботоксины в пределах семейства *Aspergillaceae* Link: α -сарцин (ЛД₅₀ = 12.0 мг/кг, мыши, внутривенно) и митогиллин (ЛД₅₀ = 0.06 мг/кг, обезьяны, внутривенно) (Olombrada et al., 2017).

Поскольку как мишень данное образование универсально, способность к продукции нарушающих ее работу токсинов получила широкое распространение среди живых организмов (Lapadula, Ayub, 2017). Среди шляпочных грибов способность к ингибированию рибосомального синтеза описана относительно недавно. Необходимо заметить, что уровень изученности многих рибонуклеаз макромицетов, оказывающих цитотоксическое действие, недостаточен для их строгого отнесения к той или иной группе токсинов.

Активность подобного рода выявлена и охарактеризована среди белков в составе плодовых тел *Вольвариеллы вольвовой* (*V. volvacea*), Опенка зимнего (*F. velutipes*), Головача круглого (*Calvatia caelata* (Bull.) Morgan), Лиофиллюма симедзи (*Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo), Гипсизигуса мраморного (*Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow), Оксипоруса коркового (*Oxyporus corticola* (Fr.) Ryvarden) и Вешенки клубнеплодной (*Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer) (Белова, 2018; Wong et al., 2020). Рибонуклеазы в пределах этих видов лишены способности к клеточной пенетрации, однако они обладают высокой активностью на модели

ингибирования синтеза протеинов в бесклеточной среде. Например, IC₅₀ рибосом калкаелина (*C. caelata*), плевтурегина (*P. tuber-regium*) и фламмулина (*F. velutipes*) составляют 4.0, 0.5 и 0.25 нмоль/л соответственно (Wong et al., 2020).

Несмотря на то, что перечисленные белки относят (Wong et al., 2020) к I типу RIP-токсинов, среди них способность к депуринизации, отличающая RIP от риботоксинов, была отмечена только у вольварина (*V. volvaceae*), мраморина и гипсина (*H. marmoreus*), а также порицина (*O. corticola*), токсичность которого для крыс при внутрибрюшинном введении составляет ЛД₅₀ = 791 мг/кг (Lapadula, Ayub, 2017). Вольварин, как и многие токсины RIP I типа, проявляет абортивную — ЕД₅₀ (полуэффективная доза) = 0.15 мг/особь (мыши, внутрибрюшинно) и дезоксирибонуклеазную *in vitro* активности — IC₅₀ = 0.42 мкмоль/л. Для гипсина и порицина, помимо абортивного, показан тератогенный эффект. Известно, что в ходе цитотоксического процесса они действуют по внешнему апоптотическому пути, активируя каспазу 8 (Ng et al., 2010). Тем не менее, в составе геномов *V. volvacea* и *H. marmoreus* консервативные последовательности, ответственные за биосинтез каталитического центра рибосом-инактивирующих токсинов, выявлены не были (Yao et al., 1998).

Таким образом, распределение большинства известных грибных белков, инактивирующих рибосом-опосредованный синтез, между RIP- и риботоксинами остается предметом дискуссий. Изначально ошибочно к RIP I типа был причислен один из первых известных белков с рибонуклеазной активностью среди базидиомицетов — эгеритин (17.0 кДа) (Landi et al., 2017). Ранее с эгеритином связывали пищевые интоксикации после умеренного потребления культивируемой в пищевых целях *A. aegerita*, в данный момент эту роль отводят рассмотренному выше эгеролизину (Jin et al., 2014). Активное состояние риботоксина требует присутствия двухвалентных катионов: *in vitro* оптимальный эффект подавления белкового синтеза IC₅₀ = 0.15 нмоль/л наблюдают в условиях насыщения раствора Zn²⁺ (Jin et al., 2014; Ruggiero et al., 2019). При крайне высокой активности в отношении насекомых, он не активен против нематод и слаботоксичен в отношении млекопитающих. Введение грызунам лиофилизата эгеритина в течение недели приводит к развитию жирового гепатоза и почечного повреждения. Тем не менее, его острая внутрижелудочная токсичность невелика и составляет ЛД₅₀ = 8.8 г/кг, в то время как количество эгеритина, экстрагируемого из свежих плодовых тел, едва достигает 12 мг/кг (Landi et al., 2017).

Большее, в сравнении с эгеритином, токсикологическое значение представляет ряд рибосом-инак-

тивирующих токсинов среди болетовых грибов, которые, помимо нарушения работы рибосомального комплекса, вызывают массивный тромбоз (Gachet et al., 1996; Matsuura et al., 2007). В 1986 г. после двух случаев интоксикаций в результате потребления в сыром виде Ксантоконииума родственного (*Xanthoconium affine* (Peck) Singer ≡ *Boletus affinis* Peck) были выявлены ядовитые свойства термолабильного протеина массой 22.0 кДа болаффинина — ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении мышам составляет 61 мг/кг (Ennamany et al., 1995a). Следует отметить, что ранее не известный для наших территорий *X. affine* был обнаружен на о. Кунашир в 2016 г. Более устойчив к внешним воздействиям болесатин Руброболета сатанинского (*Rubroboletus satanas* (Lenz) Kuan Zhao et Zhu L. Yang ≡ *Boletus satanas* Lenz). В связи с этим интоксикации с летальным исходом встречаются при потреблении *R. satanas* даже после предварительной обработки (Ennamany et al., 1995b; Merlet et al., 2012). Из плодовых тел Болета ядовитого (*Boletus venenatus* Nagas) выделен дублирующий его N-концевую последовательность боловенин. Боловенин с массой 33.0 кДа обладает *per os* токсичностью для мышей ЛД_{50/24 ч} = 10 мг/кг (Matsuura et al., 2007).

В отличие от болаффинина, болесатин — мономерный токсин из 567 аминокислотных остатков массой 63.0 кДа, термостабилен при температурах до 70°C и относительно устойчив к протеолизу в просвете кишки (Kretz et al., 1991a,b). Гликопротеин проявляет двухфазную активность, ингибируя биосинтез белка у грызунов при внутрибрюшинном введении в дозах более 0.8 мг/кг, вместе с тем выступая в качестве активатора иммунного ответа и фактора пролиферации лимфоцитов при 0.05 мг/кг (Licastro et al., 1993). Для крыс суточная ЛД₅₀ болесатина при внутривенном введении составляет 0.15 мг/кг, при внутрибрюшинном — 1.0 мг/кг, в то время как пероральная токсичность для мышей составляет ЛД_{50/24 ч} = 3.3 мг/кг (Kretz et al., 1991a; Gachet et al., 1996). Лектиновый домен токсина детально не охарактеризован, однако известно, что он опосредует образование внутрисосудистого тромбоза, а галактоза в концентрации 23 ммоль/л снижает уровень его способности к агглютинации на 50% от исходного уровня (Ennamany et al., 1995b).

При внутрижелудочном поступлении ¹⁴C-болесатин наполовину проникает в кровь в течение 2 ч. После фазы перераспределения, его находят в эпителии кишки, почках, печени и в меньшей степени в тимусе, селезенке и легких. Так, внутрижелудочное введение крысам 1.65 мг/кг токсина приводит к ингибированию белкового анаболизма в почках на 26% и в печени на 48%. Тканевая концентрация подавления белкового синтеза токсина варьирует мало и составляют IC₅₀ = 9 мкг/мл. В течение 24 ч с момента начала интоксикации всо-

савшийся токсин на 80% элиминирует через почки — скорость экскреции у грызунов составляет в среднем 0.67 мл/мин (Ennamany et al., 1995b).

При попадании среднесмертельных доз болесатина в желудок, смерть животных наступает в промежутке между 16 и 24 ч от начала интоксикации (Kretz et al., 1991a). Гибель в большинстве случаев возникает в результате массивного тромбоза. Вместе с этим наблюдают умеренно выраженный гастроэнтерит, значимые дистрофические изменения в легких, печени и почках (Kretz et al., 1991b; Gachet et al., 1996). Болесатин *in vitro* безызбирательно по группам крови человека агглютинирует эритроциты в диапазоне концентраций от 20 до 40 нмоль/л и тромбоциты при 320 нмоль/л. Введение аспирина, гепарина и клопидогреля предотвращает внутрисосудистое свертывание у грызунов, но не оказывает защитного эффекта на уровне среднесмертельных доз (Ennamany et al., 1995a).

Показано, что болесатин также способен к гидролизу макроэргических нуклеозидтрифосфатов и ингибированию репликации ДНК ($IC_{50} = 20$ мкг/мл) (Ennamany et al., 1995a,b). В этой связи авторами сделан поспешный вывод, что цитотоксичность болесатина опосредована в большей степени гидролизом оснований вне рибосом, а не недостатком функциональных белков. Не преуменьшая значимости серии исследований, которые носят пионерский характер и были выполнены до начала активного обсуждения этих механизмов в качестве отличительной черты RIP от риботоксинов, следует отметить, что данное ошибочное заключение до сих пор широко цитируют как в любительских справочниках, так и в некоторых медицинских руководствах по лечению отравлений.

В настоящее время вне ribосомальные рибонуклеазная и нуклеозидтрифосфатазная активности обнаружены для подавляющего большинства растительных RIP-токсинов (Wong et al., 2020). В то же время, посредством изучения 52 различных RIP показано (Barbieri et al., 1997), что каждый из рассмотренных токсинов был способен катализировать *in vitro* разрушение связей аденина в составе ДНК. Известно, что вне ribосомальные мишени характеризуются случайной встречаемостью последовательности GAGA и еще более низкой вероятностью возникновения специфической конфигурации, характерной для SRL, которые необходимы для высокого уровня аффинитета к RIP-токсинам. Поэтому считают, что вне ribосомальные поли- и мононуклеотидные субстраты играют роль медленных и, как следствие, не основных биологических мишеней для данного класса токсинов (Guidebook to protein..., 1997). Таким образом, несмотря на то, что нарушаемые болесатином структуры вне ribосо-

мальных нуклеотидов могут быть задействованы как в обмене макроэргов, так и в развитии стохастических эффектов, рРНК, по логике вещей, сохраняет для данного рибосом-инактивирующего протеина статус предпочтительного субстрата, опосредующего его первостепенные токсикогенные эффекты.

Активаторы иммунной системы

Несмотря на то, что наличие антигенных свойств характерно для высокомолекулярных белков, к специфическим активаторам иммунной системы и иммунотоксикантам относят ксенобиотики, которые вызывают иммуносупрессию, усиление иммунитета или аутоиммунитета, либо индуцируют аллергические реакции. Отдельные бактериальные токсины могут воздействовать непосредственно на Т-клетки и антигенпрезентирующие эффекторы. Например, пирогенные токсины-суперантигены PTSAg (pyrogenic toxin-superantigens): стафилококковые энтеротоксин и токсин синдрома токсического шока TSST-1, пирогенные экзотоксины стрептококков, способны связывать главный комплекс гистосовместимости II типа и вариабельные β -субъединицы Т-клеточного рецептора. К следствиям Т-клеточного связывания с токсинами подобного рода относят пролиферацию лимфоцитов, а также массивное высвобождение активных форм ИЛ-1, -2 и -6, γ -IFN и ФНО. Совместно эти цитокины приводят к развитию симптомов, напоминающих системную воспалительную реакцию (Schmitt et al., 1999; Matsuyama et al., 2014).

Аналогичным образом могут действовать некоторые продуцируемые макромицетами лектины, для которых известна митогенная активность в отношении Т-хелперов 1-го типа (табл. 2). Вместе с тем среди макромицетов известно около 30 иммуномодулирующих белков FIP (fungal immunomodulatory proteins). Представляя одно из направлений разработки новых лекарственных средств лектины FIP характеризуются разнонаправленными механизмами взаимодействия с иммунитетом (Xu et al., 2011).

Среди лектинов съедобных грибов наиболее выраженное иммуностимулирующее действие выявлено для лектина VVL в составе базидиома Вольвариеллы вольвовой (*V. volvacea*). Так, по эффектам индукции выброса ИЛ-2 и ФНО и клеточного прироста Т-хелперов 1-го типа лектин VVL в девять раз превосходит эталонную активность конковаина А. Известно, что активация и пролиферация клеток VVL опосредована Ca^{2+} -зависимым путем, о чем свидетельствует наблюдаемое увеличение внутриклеточного притока иона и ингибирование вызванных им эффектов посредством блокатора кальциневрина циклоспорина А (Sze et al., 2004). Аналогичные эффекты

Таблица 2. Митогенный потенциал некоторых лектинов макромицетов в отношении лимфоцитов человека (адаптировано по: Xu et al., 2011; Hassan et al., 2015)

Лектин	IC ₅₀ , мкмоль/л	Продуцент
VVL	0.12	<i>Volvariella volvacea</i> (Bull.) Singer
HRL	0.15	<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff. ex Fr.) Kauffman
ALL	1	<i>Floccularia luteovirens</i> (Alb. & Schwein.) Pouzar ≡ <i>Agaricus luteovirens</i> Alb. & Schwein.
BEL	1	<i>Boletus edulis</i> Bull.
ACG	2	<i>Cyclocybe parasitica</i> (G. Stev.) Vizzini ≡ <i>Agrocybe parasitica</i> G. Stev.
PCL	2	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> Singer
SCL	4	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.
GCL	1.5	<i>Ganoderma capense</i> (Lloyd) Teng
HEA	20	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers.
CML	26	<i>Cordyceps militaryaris</i> (L.) Fr.
XSL	31.2	<i>Boletus ferrugineus</i> (Schaeff.) Alessio ≡ <i>Xerocomus spadiceus</i> (Schaeff. Ex Fr.) Quéf.

лектина ALL Флоккулярии желто-зеленоватой (*F. luteovirens*), которые в сравнении с VVL устойчивы к термическим, кислотно-основным изменениям и дегидратации в широком диапазоне, используют в качестве терапевтического средства (Hassan et al., 2015).

Избирательная митогенная активность в отношении Т-лимфоцитов человека, которая приводит к развитию выраженного воспалительного ответа, выявлена для рассмотренного выше рибосом-инактивирующего болесатина. В диапазоне от 1 до 20 нг/мл (0.016–0.3 нмоль/л) токсин *R. satanas* вызывает избирательный прирост Т-лимфоцитов, по силе превышающий действие селективного митогена фитогемагглютинаина РНА в концентрации 20 мкг/мл. Тем не менее, при инкубации иммунокомпетентных клеток в среде, содержащей 10 мкг/мл токсина, его митогенный потенциал полностью нивелируется, что связывают с развитием эффекта инактивации белкового синтеза (Ennamany et al., 1998). В моноклеарных клеточных культурах оптимальные митогенные дозы болесатина вызывают высвобождение ИЛ-1α и -1β, ИЛ-2, концентрации которых превышают контрольные показатели к 72 ч наблюдений в среднем в 10 раз (Licastro et al., 1993). В рамках митогенного эффекта, помимо ИЛ-2, болесатин напрямую и опосредованно, через высвобождение инозитолтрифосфата, активирует протеинкиназу С – РКС (protein kinase C). Внутривенное введение токсина грызунам в дозах 100 и 200 мкг/кг приводит к приросту активности цитозольных киназ в 5.9 и 6.2 раза соответственно. На этом фоне у животных наблюдают гиперергическую реакцию со стороны маркеров системного воспалительного ответа (Licastro

et al., 1993; Ennamany et al., 1995a,b). Плазменным концентрациям ИЛ-1β, которые аналогичны полученным в ходе серии исследований (Licastro et al., 1993), у кроликов сопутствует состояние перераспределительного шока, сопровождаемого нарушением доставки кислорода и утилизации его тканями, а также гипоперфузией последних (Matsuyama et al., 2014).

В подтверждение перечисленным экспериментальным исследованиям описаны (Merlet et al., 2012) 7 нелетальных случаев иммунореактивного состояния после потребления Руброболета сатанинского (*R. satanas*). В течение 24 ч от начала интоксикации концентрация прокальцитонина в плазме крови пораженных составляла в среднем 25.4 нг/мл, достигая у одного пострадавшего 49 нг/мл. Прокальцитонин представляет собой специфический, чувствительный и широко применяемый маркер клинической диагностики сепсиса, а его концентрации в плазме крови более 10 нг/мл, как правило, указывают на тяжелое течение множественной органной дисфункции, сопровождаемой шоком. В связи с наблюдением 2011 г. гиперпрокальцитонинемический синдром выделяют (White et al., 2019) в отдельную нозологическую форму среди мицетизмов, которая представляет одну из редких причин повышения данного маркера неинфекционной этиологии.

Известны лектины макромицетов, которые могут оказывать иммуносупрессивное действие. Так, лектин 42.0 кДа Шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach) подавляет активацию Т- и В-лимфоцитов, а TML-1 и TML-2 – лектины Рядовки монгольской (*Tricholoma mongolicum* S. Imai) – снижают численность их популяции (Wang et al., 1995). Вместе с тем среди перфоринов

описан зависимый от каспазы 1 эффект активации инфламасом, которые через комплекс промежуточных путей индуцируют гибель макрофагов и нейтрофилов (Bonfini, Buchon, 2016).

Протеазы

Протеолитические ферменты, также известные как протеазы, протеиназы и пептидазы, присутствуют во всех организмах. В плодовых телах макромицетов они выполняют как эндогенные, так и экзогенные функции. Для макромицетов показана тесная связь между видом секретируемых ими протеиназ и трофическим типом этих грибов (Денисова, 2009). Считают, что наиболее совершенные протеолитические механизмы характерны для древоразрушающих макромицетов, из которых наибольшего внимания с точки зрения фармакологической биотехнологии были удостоены металло- и сериновые протеазы (Кудрявцева и др., 2008).

Как показывают многочисленные исследования, внеклеточные протеазы ксилотрофов и сапрофитов лигнотрофной группы направлены на разрушение древесины и представляют с эволюционной точки зрения довольно развитый ферментативный аппарат (Sabotić et al., 2015). Некоторые из них, например субтилизино- и трипсиноподобные протеазы, рассматривают как факторы патогенности грибов в отношении растений, то есть их присутствие может указывать на способность макромицета жить и размножаться на живой ткани растения-хозяина, постепенно разрушая ее. Вместе с тем полагают, что протеазы макромицетов, подобно протеолитическим токсинам микроорганизмов, способны при попадании в клетки животных организмов специфически обеспечивать деградацию регуляторных белков, контролирующих ответ на тепловой шок, SOS-путь репарации ДНК и программируемой клеточной гибели (Кудрявцева и др., 2008), а также путем активации плазминогена опосредовать лизис кровяного сгустка (Денисова, 2009).

Внимание исследователей привлекает способность протеаз макромицетов к гидролизу плазминогена и фибрина млекопитающих. Подобная активность востребована в медицинской практике в лечении тромботических осложнений, и в ходе клинического решения этой задачи уже продолжительное время используют стрептокиназу — токсин гемолитического стрептококка — и аналогичные ей белки. Способность к биосинтезу макромицетами протеинов фибрино- и тромболитического действия впервые была показана на примере протеаз Опенка зимнего (*F. velutipes*) (Фалина и др., 1978).

Несмотря на наличие основополагающих работ, до конца двадцатого столетия подобная ак-

тивность среди протеолитических ферментов высших грибов оставалась практически не изученной. Группой отечественных исследователей путем оценки экстрактов около 400 видов выявлен список грибов, продуцирующих субстратспецифичные к фибрину и тромбину протеазы, снижающие свертываемость крови и ускоряющие лизис сосудистых тромбов (Денисова, 2009). Кроме этого, в решении актуальной проблемы ими были предложены лабораторные регламенты получения фибринолитических препаратов из глубинных культур и плодовых тел Навозников пушистого (*Coprinus lagopides* P. Karst) и домашнего (*Coprinus domesticus* (Bolton) Gray). Предложенный способ позволяет экстрагировать из плодовых тел *C. lagopides* фибринолизин с выходом 3.0 мг/кг и удельной активностью 50–100 Ед/мг. На модели индуцированного тромбоза бедренной артерии крыс показано, что тромбо- и фибринолитические эффекты протеазы Навозника пушистого возникают при ее введении в дозе 0.5 мг/кг, в то время как 2.5 мг/кг позволяет в течение суток восстанавливать нарушенный кровоток сосудов конечности на 93% от исходного уровня (Шамцян и др., 2011).

На моделях *in vitro* рассматривают (Денисова, 2009) терапевтический потенциал протеолитических ферментов Хлорофиллюма свинцового (*Chlorophyllum molybdites* (G. Mey.) Masee = *Lepiota morgani* Peck). Гриб известен своими токсичными свойствами, которые связывают с молибдофиллизином — Zn^{2+} -зависимой протеазой массой 23.0 кДа. Интоксикации *C. molybdites*, как правило, ассоциированы с желудочно-кишечными расстройствами, нарушениями свертывающей системы крови и системной вазоплегией (Eilers, Nelson, 1974).

Молибдофиллизин при pH = 7.0 сохраняет активность при температурах до 60°C, теряя ее при 100°C в течение 20 мин. Внутривенная токсичность лиофилизата молибдофиллизина для собак варьирует в диапазоне ЛД₅₀ = 78–84 мг/кг (Eilers, Nelson, 1974). Как и в клинических наблюдениях, в условиях экспериментального исследования введенный внутривенно до и после норадреналина он оказывает выраженный гипотензивный эффект (Yamada et al., 2012). Это можно расценивать исключительно как проявление α_1 -обратного агонизма (Yamada et al., 2012) и отвергать возможность других механизмов влияния молибдофиллизина на системное сосудистое сопротивление. Но подобные выводы дискутируемы в связи с неокончательно охарактеризованной активностью фермента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги рассмотрения токсинов макромицетов со структурой высокомолекулярных белков, можно отметить, что данный обзор представляет практически первую попытку обобщить и системно проанализировать их ядовитые свойства. Анализ литературы свидетельствует о том, что высокомолекулярные белковые токсины грибов изучают, если возможна перспектива их использования в биотехнологии и медицинской практике либо их продуценты относятся к модельным организмам для изучения биологической роли синтезируемых ими ферментов. В этой связи необходимо заметить, что нередко полученные в ходе исследований данные могут казаться недостаточными для строгого отнесения ядовитого белка к тому или иному классу токсинов. Несмотря на некоторые проведенные параллели с аналогичными или более известными соединениями, продуцируемыми представителями других царств, краеугольным камнем в понимании токсинов макромицетов остается отсутствие их собственной систематизации.

До настоящего времени ядовитые белки исследованы среди небольшой части видов огромного разнообразия таксонов и экологических групп высших грибов. Вместе с тем ввиду различной практической значимости они изучены в неодинаковой степени. Так, в отличие от достаточно полно охарактеризованного токсического процесса, провоцируемого эгеролизинами, в данный момент предприняты лишь единичные попытки по выявлению среди грибов продуцентов токсинов, влияющих на вторичные мессенджеры. За последнее время инструменты молекулярного и клеточного анализа предоставили новые возможности в их изучении.

Несомненно, что исследования в направлении детализации ядовитых свойств высших грибов актуальны и привлекают все больше внимания, а ответы на многие из этих вопросов будут получены уже в ближайшем будущем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белова Н.В. Рибонуклеазы высших грибов, перспективные в биомедицинских исследованиях // Микол. фитопатол. 2018. Т. 52. № 5. С. 301–305.

Вассер С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Биосфера. 2015. Т. 7. № 2. С. 238–248.

Денисова Н.П. Тромболитические свойства ферментов базидиальных грибов // Пробл. мед. микол. 2009. № 4. С. 3–9.

Кудрявцева О.А., Дунаевский Я.Е., Камзолкина О.В., Белозерский М.А. Протеолитические ферменты грибов: особенности внеклеточных протеаз ксилотрофных базидиомицетов // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 725–737.

Магазов Р.Ш., Степанов А.В., Ченур С.В., Савельев А.П. Токсины биологического происхождения: природа, структура, биологические функции и диагностика / Ред. Р.Ш. Магазов. Уфа: Башкирская энциклопедия, 2019. 352 с.

Современные методы изучения структуры и функций ионных каналов / Ред. О.С. Соколова. М.: КМК, 2020. 316 с.

Фалина Н.Н., Морозова Э.Н., Денисова Н.П. и др. Препарат фибринолитического действия из зимнего опенка (*Flammulina velutipes*) // Прикл. биохим. микробиол. 1978. Т. 14. № 5. С. 699–701.

Шамцян М.М., Петрищев Н.Н., Денисова Н.П. и др. Ферментный препарат тромболитического и фибринолитического действия из базидиального гриба рода *Coprinus* // Патент на изобретение RU 2435848 C1. 10.12.2011.

Al-Deen I.H.S., Twaij H.A.A., Al-Badr A.A., Istarabadi T.A. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice // J. Ethnopharmacol. 1987. V. 21. № 3. P. 297–305.

Antonyuk V.O., Klyuchivska O.Y., Stoika R.S. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: purification, characteristics and action towards mammalian cells // Toxicon. 2010. V. 55. № 7. P. 1297–1305.

Barbieri L., Valbonesi P., Bonora E. et al. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A) // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 3. P. 518–522.

Berry C., Crickmore N. Structural classification of insecticidal proteins – towards an *in silico* characterisation of novel toxins // J. Invertebr. Pathol. 2017. V. 142. P. 16–22.

Bonfini A., Buchon N. Pore-forming toxins trigger the purge // Cell Host Microbe. 2016. V. 20. № 6. P. 693–694.

Dal Peraro M., van der Goot F.G. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 14. № 2. P. 77–92.

Eilers F.I., Nelson L.R. Characterization and partial purification of the toxin of *Lepiota morgani* // Toxicon. 1974. V. 12. № 6. P. 557–563.

Ennamany R., Kretz O., Creppy E.E. Effect of bolesatine on phospholipid/calcium dependent protein kinase in Vero cells and in rat thymus // Arch. Toxicol. 1995a. V. 69. № 9. P. 624–630.

Ennamany R., Laverge J.P., Reboud J.P. et al. Mode of action of bolesatine, a cytotoxic glycoprotein from *Boletus satanas* Lenz. mechanistic approaches // Toxicology. 1995b. V. 100. № 1–3. P. 51–55.

Ennamany R., Bingen A., Creppy E.E. et al. Aspirin and heparin prevent hepatic blood stasis and thrombosis induced by the toxic glycoprotein bolesatine in mice // Hum. Experiment. Toxicol. 1998. V. 17. № 11. P. 620–624.

- Faulstich H., Bühring H.J., Seitz J. Physical properties and function of phallolysin // *Biochemistry*. 1983. V. 22. № 19. P. 4574–4580.
- Fernandez Espinar M.T., Labarère J. Cloning and sequencing of the Aa-Pril gene specifically expressed during fruiting initiation in the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, and analysis of the predicted amino-acid sequence // *Curr. Genet.* 1997. V. 32. № 6. P. 420–424.
- Ford W.W. The distribution of haemolysins, agglutinins, and poisons in fungi, especially the Amanitas, the Entolomas, the Lactarius and the Inocybes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1911. V. 2. P. 285–318.
- Frangž R., Šuput D., Molgó J., Benoit E. Ostreolysin A / pleurotolysin B and equinatoxins: structure, function and pathophysiological effects of these pore-forming proteins // *Toxins*. 2017. V. 9. № 4. P. 128.
- Gachet C., Ennamany R., Kretz O. et al. Bolesatine induces agglutination of rat platelets and human erythrocytes and platelets *in vitro* // *Hum. Experiment. Toxicol.* 1996. V. 15. № 1. P. 26–29.
- Gouaux E. Channel-forming toxins: tales of transformation // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. V. 7. № 4. P. 566–573.
- Guidebook to protein toxins and their use in cell biology / Eds R. Rappuoli, C. Montecucco. Oxford: Oxford Univ. Press, 1997. 275 p.
- Hassan M.A., Rouf R., Tiralongo E. et al. Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. № 4. P. 7802–7838.
- Henrici A.T. An endotoxin from *Aspergillus fumigatus* // *J. Immunol.* 1939. V. 36. P. 319–338.
- Jin Y., Che T., Yin Y. et al. Lethal protein in mass consumption edible mushroom *Agrocybe aegerita* linked to strong hepatic toxicity // *Toxicon*. 2014. V. 90. P. 273–285.
- Juntos P., Rebolj K., Sepčić K. et al. Ostreolysin induces sustained contraction of porcine coronary arteries and endothelial dysfunction in middle- and large-sized vessels // *Toxicon*. 2009. V. 54. № 6. P. 784–792.
- Kretz O., Creppy E.E., Dirheimer G. Disposition of the toxic protein bolesatine in rats: its resistance to proteolytic enzymes // *Xenobiotica*. 1991a. V. 21. № 1. P. 65–73.
- Kretz O., Creppy E.E., Dirheimer G. Characterization of bolesatine, a toxic protein from the mushroom *Boletus satanas* Lenz and its effects on kidney cells // *Toxicology*. 1991b. V. 66. № 2. P. 213–224.
- Landi N., Pacifico S., Ragucci S. et al. Purification, characterization and cytotoxicity assessment of ageritin: the first ribotoxin from the basidiomycete mushroom *Agrocybe aegerita* // *Biochim. Biophys. Act. Gen. Subj.* 2017. V. 1861. № 5. Pt A. P. 1113–1121.
- Lapadula W., Ayub M. Ribosome inactivating proteins from an evolutionary perspective // *Toxicon*. 2017. V. 136. P. 6–14.
- Licastro F., Morini M. C., Kretz O. et al. Mitogenic activity and immunological properties of bolesatine, a lectin isolated from the mushroom *Boletus satanas* Lenz. // *Int. J. Biochem.* 1993. V. 25. № 5. P. 789–792.
- Lin J., Lin Y., Chen C. et al. Cardiotoxic protein from edible mushrooms // *Nature*. 1974. V. 252. P. 235–237.
- Lin S., Lo Y., Lin J., Liaw Y.-C. Crystal structures and electron micrographs of fungal volvatoxin A₂ // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 343. № 2. P. 477–491.
- Lukyanova N., Kondos S.C., Farabella I. et al. Conformational changes during pore formation by the perforin-related protein pleurotolysin // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 2. P. e1002049.
- Ly H., Kong Y., Yao Q. et al. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects // *Phyto-medicine*. 2009. V. 16. № 2–3. P. 198–205.
- Mancheño J.M., Tateno H., Goldstein I.J. et al. Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 17. P. 17251–17259.
- Martin F., Aerts A., Ahrén D. et al. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis // *Nature*. 2008. V. 452. P. 88–92.
- Matsuura M., Yamada M., Saikawa Y. et al. Bolevenine, a toxic protein from the Japanese toadstool *Boletus venenatus* // *Phytochemistry*. 2007. V. 68. № 6. P. 893–898.
- Matsuyama S., Hayakawa K., Sakuramoto K. et al. Vasodilating prostaglandin E1 does not reproduce interleukin-1β-induced oxygen metabolism abnormalities in rabbits // *Acute Med. Surg.* 2014. V. 2. № 1. P. 40–47.
- Merlet A., Dauchy F.A., Dupon M. Hyperprocalcitonemia due to mushroom poisoning // *Clin. Infect. Dis.* 2012. V. 54. № 2. P. 307–308.
- Mondego J.M., Carazzolle M.F., Costa G.G. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom disease of cacao // *BMC Genom.* 2008. V. 9. P. 548.
- Mori S., Nakagawa-Yoshida K., Tsuchihashi H. et al. Mushroom worker's lung resulting from indoor cultivation of *Pleurotus ostreatus* // *Occup. Med.* 1998. V. 48. № 7. P. 465–468.
- Nayak A.P., Green B.J., Beezhold D.H. Fungal hemolysins // *Med. Mycol.* 2013. V. 51. № 1. P. 1–16.
- Ng T., Lam J., Wong J. et al. Differential abilities of the mushroom ribosome-inactivating proteins hypsin and velutin to perturb normal development of cultured mouse embryos // *Toxicol. in vitro*. 2010. V. 24. № 4. P. 1250–1257.
- Ngai P., Ng T. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. P. 1185–1191.
- Novak M., Krpan T., Panevska A. et al. Binding specificity of ostreolysin A₆ towards Sf9 insect cell lipids // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2020. V. 1862. № 9. P. e183307.
- Odenthal K.P., Seeger R., Vogel G. Toxic effects of phallolysin from *Amanita phalloides* // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1975. V. 290. № 2–3. P. 133–143.
- Odenthal K.P., Seeger R., Braatz R. et al. Damage *in vitro* to various organs and tissues by rubescensolysin from the edible mushroom *Amanita rubescens* // *Toxicon*. 1982. V. 20. № 4. P. 765–781.
- Olombrada M., Lázaro-Gorines R., López-Rodríguez J. et al. Fungal ribotoxins: a review of potential biotechnological applications // *Toxins*. 2017. V. 9. № 2. P. 1–21.
- Ota K., Leonardi A., Mikelj M. et al. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B // *Biochim.* 2013. V. 95. № 10. P. 1855–1864.
- Rebolj K., Batista U., Sepčić K. et al. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cell viability *in vitro* // *Toxicon*. 2007. V. 49. № 8. P. 1211–1213.
- Ruggiero A., Garcia-Ortega L., Moreira M. et al. Binding and enzymatic properties of ageritin, a fungal ribotoxin with novel zinc-dependent function // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 136. P. 625–631.

- Sabotič J., Ohm R.A., Künzler M.* Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 100. № 1. P. 91–111.
- Schmitt C.K., Meysick K.C., O'Brien A.D.* Bacterial toxins: friends or foes? // *Emerg. Infect. Dis.* 1999. V. 5. № 2. P. 224–234.
- Seeger R.* Demonstration and isolation of phallolysin haemolytic toxin from *Amanita phalloides* // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1975. V. 287. P. 277–287.
- Seeger R., Bunsen E.* Degranulation of rat mast cells *in vitro* by the fungal cytolytins phallolysin, rubescenslysin and fascicularelysin // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1980. V. 315. № 2. P. 163–166.
- Seeger R., Odenthal K.P., Mengs U.* Toxic effects in mouse and rat of rubescenslysin from *Amanita rubescens* // *Toxicol.* 1981. V. 19. № 3. P. 409–417.
- Skočaj M., Yu Y., Grundner M. et al.* Characterisation of plasmalemmal shedding of vesicles induced by the cholesterol/sphingomyelin binding protein, ostreolysin A-mCherry // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1858. № 11. P. 2882–2893.
- Stasyk T., Lutsik-Kordovsky M., Wernstedt C. et al.* A new highly toxic protein isolated from the death cap *Amanita phalloides* is an L-amino acid oxidase // *FEBS J.* 2010. V. 277. № 5. P. 1260–1269.
- Sze S., Ho J., Liu W.* *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway // *J. Cell. Biochem.* 2004. V. 92. № 6. P. 1193–1202.
- Vrecl M., Babnik M., Sepčić K. et al.* Effect of the ostreolysin A/pleurotolysin B pore-forming complex on intracellular Ca^{2+} activity in the vascular smooth muscle cell line A10 // *Toxicol. in vitro.* 2015. V. 29. № 8. P. 2015–2021.
- Wang H.X., Ng T.B., Liu W.K. et al.* Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum* // *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1995. V. 46. № 6. P. 508–513.
- Weng Y., Lin Y., Hsu C., Lin J.-Y.* Functional domains of a pore-forming cardiotoxic protein, volvatoxin A₂ // *J. Boil. Chem.* 2003. V. 279. № 8. P. 6805–6814.
- White J., Weinstein S.A., De Haro L. et al.* Mushroom poisoning: a proposed new clinical classification // *Toxicol.* 2019. V. 157. P. 53–65.
- Wong J.H., Bao H., Ng T.B. et al.* New ribosome-inactivating proteins and other proteins with protein synthesis-inhibiting activities // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. № 10. P. 4211–4226.
- Xu X., Yan H., Chen J., Zhang X.* Bioactive proteins from mushrooms // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. № 6. P. 667–674.
- Yamada M., Tokumitsu N., Saikawa Y. et al.* Molybdophyllin, a toxic metalloendopeptidase from the tropical toadstool *Chlorophyllum molybdites* // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. V. 20. № 22. P. 6583–6588.
- Yao Q., Yu M., Ooi L. et al.* Isolation and characterization of a type 1 ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the edible mushroom (*Volvariella volvacea*) // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46. № 2. P. 788–792.
- Zheleva A., Tolekova A., Zhelev M. et al.* Free radical reactions might contribute to severe alpha-amanitin hepatotoxicity – a hypothesis // *Med. Hypoth.* 2007. V. 69. № 2. P. 361–367.
- Žužek M.C., Maček P., Sepčić K. et al.* Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rodents // *Toxicol.* 2006. V. 48. № 3. P. 264–271.

Actual Concepts of Higher Fungi's Toxins: High-Molecular-Weight Proteins

A. A. Khovpachev^{a, *}, V. A. Basharin^a, S. V. Chepur^{b, **}, S. V. Volobuev^{c, ***}, M. A. Yudin^b,
A. S. Gogolevsky^b, A. S. Nikiforov^b, L. B. Kalinina^c, and M. A. Tyunin^b

^aKirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

^bState Scientific-Research Test Institute of the Military Medicine, Russian Federation Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia

^cKomarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

*e-mail: vtmz@vmeda.org,

**e-mail: gniiivm_2@mil.ru

***e-mail: rbo.fungi@binran.ru

In continuation of the discussion of higher fungi's toxins, their poisonous high-molecular-weight proteins are considered. Toxins of this structure are relevant for research as compounds that can lead to intoxication in humans. They are used as tools in biotechnology, and are also being studied as promising medicines. However, from the point of view of toxinology, the poisonous proteins of macromycetes are insufficiently characterized. According to the General concepts of toxins, the basic principles of their structure are considered. The mechanisms of action implemented by perforins, amino oxidases, ribonucleases, activators of secondary messengers, immunotoxins and toxic proteases of macromycetes are analyzed. Data on the biological activity of their catalytic sites are summarized. Using the examples of agerolysins, fly agaric perforins, volvatoxin, VVL-lectin and bolesatin, modern concepts of their toxicity at the levels from molecular to organismal are revealed. It is concluded that further study of the distribution of high-molecular protein toxins will bring closer understanding of their biological role in the fruit bodies of macromycetes, and the study of more detailed mechanisms of the toxic process – to systematize them.

Keywords: higher fungi, toxins, proteins, perforins, amino oxidases, protein synthesis inhibitors, immunotoxins, proteases, poisoning

УДК 612.014.461.3:66.047.88+536.629:536.4.032(58.058)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОЙ И СВЯЗАННОЙ ВОДЫ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ С РАЗЛИЧНЫМ ОСМОТИЧЕСКИМ ДАВЛЕНИЕМ, СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДА ВЫСУШИВАНИЯ НАД ВОДООТНИМАЮЩЕЙ СРЕДОЙ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИИ

© 2021 г. Р. В. Малышев*

*Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук,
Республика Коми, Сыктывкар, Россия*

**e-mail: malrus@ib.komisc.ru*

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

После доработки 28.10.2020 г.

Принята к публикации 29.10.2020 г.

Определение соотношения связанной и свободной воды в тканях растения — один из способов оценки функционального состояния растения. Для измерения количества фракций воды в живых тканях используют методы, основанные на различных физических свойствах свободной и связанной воды. Известно, что количество связанной воды в тканях зависит от концентрации в них гидрофильных соединений. Цель настоящей работы заключалась в сравнении метода высушивания над водоотнимающим агентом и метода дифференциальной сканирующей калориметрии для определения фракций связанной и свободной воды в тканях с различным осмотическим давлением. Объектами исследования являлись паренхима из сердцевины клубня картофеля и средняя часть листа проростка пшеницы. Результат проведенного сравнения выявил ряд ограничений для каждого из методов. При использовании метода высушивания над гигроскопичными средами необходимо учитывать как концентрацию осмолитов в цитоплазме клеток, так и снижение физической проницаемости подсыхающей ткани для паров воды. Наиболее полно оценить количество свободной и связанной воды в тканях растений позволяет метод промораживания на дифференциальном сканирующем калориметре, однако этот метод следует осторожно использовать при изучении тканей с высоким содержанием молекул, сорбирующих воду.

Ключевые слова: свободная вода, связанная вода, водоотнимающий агент, осмотическое давление, дифференциальная сканирующая калориметрия

DOI: 10.31857/S004213242102006X

ВВЕДЕНИЕ

Вода является неорганическим бинарным соединением. Благодаря смещению атомов кислорода, молекула воды является полярной и представляет собой диполь. Вода — это жидкость, не имеющая вкуса и запаха, в зависимости от условий она может находиться в трех агрегатных состояниях. В растениях вода составляет до 90% массы. Оптимальное прохождение всех физиологических процессов в растениях возможно только при достаточном водообеспечении. Водный обмен является составляющей обмена веществ в цитоплазме клетки (Алексеев, 1969). Без воды невозможно проникновение веществ в клетку и выход из нее, она принимает непосредственное участие в росте и увеличении массы растения. Поступление воды в растение и ее расход точно регулируются, что формирует водный баланс рас-

тения. В тканях растений распределение воды крайне неравномерное, большая часть воды находится в протопласте клетки, около 10% депонировано в клеточной стенке (Физиология и биохимия..., 2000). Необходимо добавить, что оводненность тканей растений — величина непостоянная, изменяющаяся с течением времени и под действием факторов среды.

В живых тканях вода также находится в трех состояниях: 1) свободная вода (вода с неизменными физико-химическими свойствами), присутствующая главным образом в межклеточном пространстве; 2) слабо связанная, так называемая, межфазная вода (интерстициальная), вода из внешних слоев толстой гидратной оболочки ионов или макромолекул; 3) сильно связанная — это вода, связанная в первой гидратной оболочке или включенная в мицеллы (Nishioka et al., 1984;

Hatakeyama et al., 1987). Каждая из форм воды характеризуется определенными физическими свойствами и функциями. Свободная вода — наиболее подвижная фракция, находится между гидратированными ионами и коллоидами, главным образом участвует в процессах “переноса” веществ. Оставшиеся две фракции воды слабо и сильно связанной воды являются наименее подвижными. Считается, что связанная вода не может быть отнята из тканей при замораживании и являться растворителем (Максимов, 1944). Уникальное строение молекулы воды позволяет образовывать связи не только с ионами, но и крупными биологическими молекулами, поддерживая, тем самым, их структуру. Известно, что одна молекула белка может связать от 850 до 1000 молекул воды, а молекула целлюлозы абсорбирует на себе до трех молей воды (Некрасов, 1973; Nakamura et al., 1981; Hatakeyama et al., 1987; Rapoian et al., 2004).

Важное значение для биологических систем имеет соотношение фракций свободной и связанной воды. Свойства внутриклеточной воды влияют на ассоциацию и диссоциацию цитоскелетных структур (Clegg, 1984). Интенсивность протекания физиологических процессов в растительных тканях зависит от количества свободной воды, а с содержанием связанной воды коррелирует устойчивость растений к действию неблагоприятных факторов (Гусев, 1974; Тарабрин, 1980). Одним из важных свойств воды является способность к переохлаждению, то есть способность замерзать при температуре ниже 0°C. Это явление отмечено многими исследователями (Simatos et al., 1974; Gliguem et al., 2009; Tomaszewska-Gras, 2012). Способность воды находиться в переохлажденном состоянии имеет особое значение в процессе подготовки растения к неблагоприятному зимнему периоду. Еще до начала сезонного снижения температуры в тканях меристемы хвойных отмечается постепенный выход воды в межклеточное пространство, что способствует постепенному обезвоживанию клеток. Устойчивость воды к кристаллизации при температуре ниже 0°C существенно увеличивает диапазон времени для постепенного и безопасного обезвоживания клеток в процессе закаливания и формирования криорезистентности (Миронов, Левин, 1985; Алаудинова и др., 2007; Миронов и др., 2017).

Для определения содержания воды в растительных тканях достаточно знать массу образца до и после высушивания. Для оценки количества свободной и связанной воды в растительных тканях используют ряд методов. Первая группа методов основана на свойстве подвижности воды. Несвязанные молекулы воды быстро передвигаются по градиенту концентрации. Благодаря этому свойству количество свободной воды в растениях возможно оценить при высушивании образцов в герметичных сосудах над водоотнимающей сре-

дой или погружая ткани в гипертонический раствор сахарозы (Думанский, 1948; Физиология сельскохозяйственных..., 1967; Сулейманов, 1974; Яковец, 2011). Вторая группа методов основана на физических явлениях, проявляющихся при замерзании воды, и утверждении, что к кристаллизации способна только свободная вода (Физиология сельскохозяйственных..., 1967). Первый из этой группы метод основан на измерении доли свободной воды с помощью дилатометра. Суть данного метода заключается в определении изменения объема ткани при ее замораживании (Физиология сельскохозяйственных..., 1967; Фрашук, 1986; Гольд и др., 2008). Второй, менее распространенный метод оценки количества свободной и связанной воды в тканях, — калориметрический, в его основе лежит определение количества выделяемого тепла при фазовом переходе вода—лед (Туманов, 1940; Физиология сельскохозяйственных..., 1967; Ciesla et al., 2004; Einhorn-Stoll et al., 2012; Hatakeyama et al., 2013). Не стоит забывать и о таком методе исследования, как ядерно-магнитный резонанс, позволяющий достаточно точно идентифицировать фракции воды в растительных тканях (Жолкевич и др., 1989; Хохлова, Бочкарева, 2009).

Содержание воды и соотношение ее фракций в растении не постоянны. Изменение количества свободной и связанной воды зависит, главным образом, от количества соединений с высокой водоудерживающей способностью в клетках и тканях. Так, в конце вегетационного периода и в течение осени внутри клетки повышается концентрация осмолитов: низкомолекулярных водорастворимых белков, углеводов, аминокислот, которые связывают значительное количество воды (Романова, 1970; Некрасов, 1973; Миронов и др., 2001, 2006; Климов, 2001; Трунова, 2007; Slovakova et al., 2011). Изменение количества водорастворимых соединений в цитоплазме безусловно сказывается на ее осмотическом давлении. Как было отмечено выше, при количественном определении фракций воды в живых тканях используют методы, основанные на различных физических явлениях. Возникает закономерный вопрос: будут ли сопоставимы результаты количественного измерения фракции воды, полученные методами на основе различных физических явлений и необходимо ли при измерениях учитывать осмотический потенциал растительных тканей?

В настоящей работе приведены результаты сравнительных исследований определения количества свободной и связанной воды в растительных тканях с использованием метода высушивания над водоотнимающим агентом (концентрированной серной кислотой) и с применением метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Сравнительное исследование

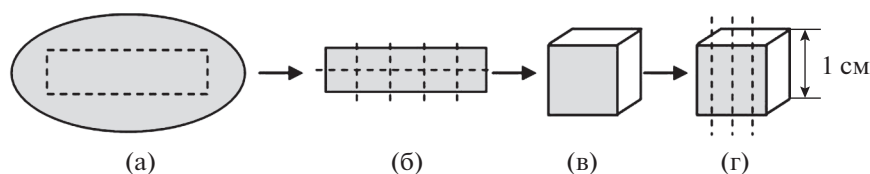


Рис. 1. Схема подготовки экспериментального материала. Клубень картофеля (а), вырезанная и разделенная центральная часть запасающей паренхимы клубня (б), используемая в измерениях часть ткани (в, г). Пунктиром показаны линии разреза.

методов проводилось на тканях с различным осмотическим давлением (P). Дисперсионный анализ и статистическую обработку результатов проводили в среде MS Excel, значимость различий оценивали с применением многогранового теста Дункана. Объем выборки для каждого из вариантов, составлял: $n = 10$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили запасающая паренхима клубня картофеля *Solanum tuberosum* L. и средняя часть первого листа четырехдневного проростка пшеницы *Triticum aestivum* L. Определения осмотического давления клеточного сока в исследуемых тканях проводили плазматическим методом по Х. де Фризу (Викторов, 1983). Приготовленные образцы тканей помещали в раствор сахарозы с различной малярной массой. Изотоническим считали раствор, в котором у клеток тканей наблюдался слабый уголкового плазмолиз. Результаты оценки осмотического давления клеточного сока в тканях объектов показали, что уголкового плазмолиз в запасающей паренхиме клубня картофеля начинался при $P \geq 24$ атм, а в листе проростка пшеницы — при $P \geq 11$ атм.

Подготовка материала для проведения измерений количества связанной и свободной фракций воды

Перед началом измерений клубни картофеля были очищены от перидермы, отмыты в проточной воде. Из центральной части запасающей паренхимы клубня вырезали кубики с гранью 1 см (рис. 1). Подготовка к измерениям листа пшеницы заключалась в отделении его от семянки непосредственно перед измерением и удалении верхней и нижней части листа, в измерениях использовали среднюю часть листа.

Методика проведения измерений количества свободной и связанной воды с высушиванием над водоотнимающим агентом

Подготовленный экспериментальный материал взвешивали и помещали в стеклянные бюксы. В каждый бюкс помещали один предварительно

измельченный образец запасающей паренхимы клубня картофеля сырой массой около 600 мг или листа пшеницы сырой массой около 100 мг. Для оценки содержания свободной воды, образцы в бюксах высушивали в эксикаторе над водоотнимающим агентом, в качестве которого использовали концентрированную серную кислоту. Образцы выдерживали в герметично закрытом эксикаторе в течение 24 ч при температуре 20–25°C. После экспозиции экспериментальный материал взвешивали повторно. Для оценки абсолютного содержания воды образцы помещали в сушильный шкаф и выдерживали их до постоянной массы при температуре 105°C. Общую оводненность, количество свободной и связанной воды в тканях определяли согласно формулам:

$$m(\text{H}_2\text{O}) = m_1 - m_2, \quad (1)$$

$$m(\text{H}_2\text{O свобод.}) = m_1 - m_3, \quad (2)$$

$$m(\text{H}_2\text{O связ.}) = m(\text{H}_2\text{O}) - m(\text{H}_2\text{O свобод.}), \quad (3)$$

где $m(\text{H}_2\text{O})$ — масса воды, содержащейся в растительных тканях; $m(\text{H}_2\text{O свобод.})$ — масса свободной воды; $m(\text{H}_2\text{O связ.})$ — масса связанной воды; m_1 — сырая масса растительных тканей; m_2 — масса растительных тканей после высушивания при 105°C; m_3 — масса растительных тканей после высушивания над серной кислотой.

Полученные количественные значения фракций воды в тканях выражали в долях по отношению к общему содержанию воды (табл. 1, 2).

Методика проведения измерений количества свободной и связанной воды с применением дифференциальной сканирующей калориметрии

Измерения температуры кристаллизации воды в тканях картофеля и листа пшеницы проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на приборе DSC-60 Shimadzu (Япония). Подготовленный материал в количестве около 30 мг помещали в алюминиевый контейнер объемом 90 мм³ и охлаждали со скоростью 1°C/мин от +5 до –30°C. Перед измерением образцы ткани клубня картофеля дополнительно измельчали до размеров 2–3 мм (рис. 2).

Таблица 1. Оводненность, доля свободной и связанной воды в тканях паренхимы клубня картофеля

Статистические параметры	Оводненность, %		Свободная вода, %		Связанная вода, %	
	сушка над конц. H_2SO_4	по данным ДСК	сушка над конц. H_2SO_4	по данным ДСК	сушка над конц. H_2SO_4	по данным ДСК
Среднее значение и ошибка	81.0 ± 1.1	83.0 ± 1.2	7.6 ± 1.3	$66.7 \pm 2.9^*$	73.4 ± 1.1	$15.9 \pm 3.0^*$
Минимум	75.9	76.2	3.0	48.9	68.9	6.0
Максимум	85.0	90.8	15.4	79.0	81.8	32.6

Примечание: * — различия значимы на уровне $p \leq 0.05$. Здесь и в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Оводненность, доля свободной и связанной воды в тканях листа проростка пшеницы

Статистические параметры	Оводненность, %		Свободная вода, %		Связанная вода, %	
	сушка над конц. H_2SO_4	по данным ДСК	сушка над конц. H_2SO_4	по данным ДСК	сушка над конц. H_2SO_4	по данным ДСК
Среднее значение и ошибка	86.0 ± 0.1	$84.6 \pm 0.4^*$	60.6 ± 2.0	$71.3 \pm 1.1^*$	25.4 ± 2.0	$13.2 \pm 1.0^*$
Минимум	84.9	82.5	52.8	66.7	10.9	6.5
Максимум	86.5	86.9	74.0	76.0	33.2	17.5

Температуру кристаллизации воды определяли по началу пика фазового перехода (рис. 3). После измерений материал высушивали при $105^\circ C$ до постоянной сухой массы. Оводненность оценивали согласно формуле (1). Свободную воду оценивали по количеству воды, претерпевшей фазовый переход, рассчитанной с использованием коэффициента удельной теплоты кристаллизации при фазовом переходе вода–лед 330 Дж/г (Ciesla et al., 2004; Tomaszewska-Gras, 2012), по формуле:

$$m(\text{замер. воды}) = 330 \times Q, \quad (4)$$

где Q — тепловой эффект при нуклеации воды, мДж; 330 — удельная теплота льдообразования для пресной воды, мДж/мг.

В настоящее время установлено, что в диапазоне от 0 до $-16^\circ C$, а по некоторым данным до $-20^\circ C$, в тканях растений замерзает фракция свободной воды, связанная вода замерзала при более низкой температуре (Бакрадзе, 1983; Миронов и др., 2001; Nowak et al., 2018). Существующая связь между температурой замерзания воды и

свободой движения молекул воды позволяет применять низкотемпературную ДСК как метод количественной оценки фракции воды в тканях растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По нашим данным средняя температура замедления воды в тканях клубня картофеля составляла $-6.8 \pm 0.2^\circ C$, в тканях листа пшеницы — $-8.8 \pm 0.5^\circ C$. Полученные значения температуры замедления воды указывают на то, что фазовый переход претерпевала фракция свободной воды.

Согласно результатам измерений, оводненность тканей клубня картофеля и листа пшеницы, оцениваемая как разница между сырой и сухой массой были близки по значениям (табл. 1, 2). Распределение долей свободной и связанной воды по данным метода сушки над серной кислотой у исследуемых образцов было различно. Паренхима клубня картофеля содержала около 8% свободной и 73% связанной воды, а ткани листа пшеницы, напротив, содержали больше свободной воды — около 60%, доля связанной воды составляла 25%.

Оценка методом ДСК не выявила существенных различий в соотношении фракций воды между исследуемыми образцами. Содержание свободной воды в клубне картофеля было более 66% а связанной — около 16% (табл. 1). Калориметрические измерения листа пшеницы показали, что в нем содержалось около 71% свободной и 13% связанной воды (табл. 2).

Необходимо сказать, что процесс испарения воды, имеющий физическую основу в живых си-

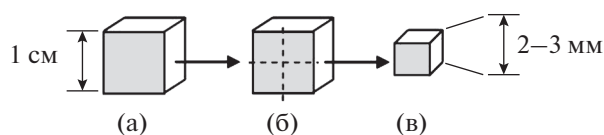


Рис. 2. Схема подготовки экспериментального материала из клубня картофеля для измерения на ДСК. Исходный объем ткани (а), линии деления исходного объема ткани (б), помещаемая в алюминиевый контейнер часть клубня картофеля (в). Пунктиром показаны линии разреза.

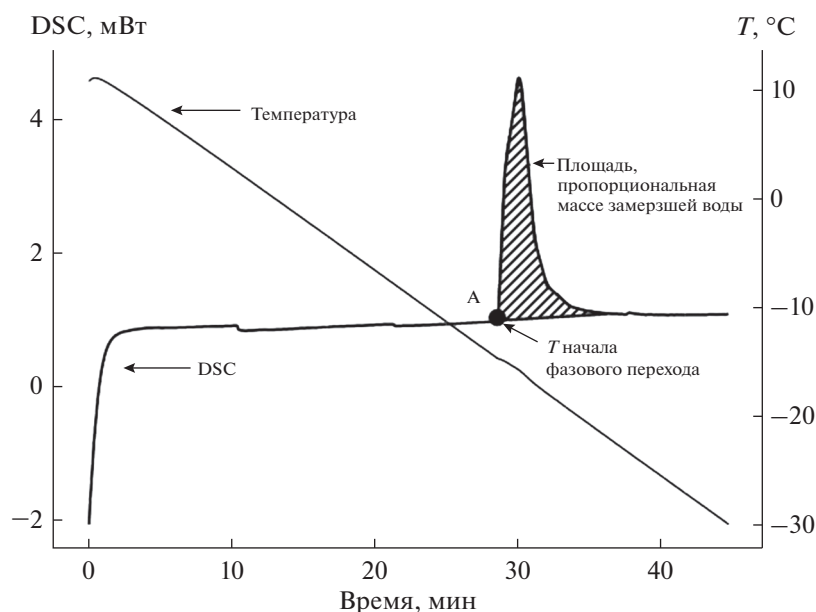


Рис. 3. Термограмма кристаллизации воды в образце.

стемах, является нелинейным. По мере убыли воды из живых тканей возрастает концентрация осмолитов, что неминуемо приводит к снижению скорости потери влаги на уровне клетки, ткани, органа. Расхождение данных, полученных калориметрически и при сушке над серной кислотой, может быть связано с рядом факторов, начиная с влияния осмотического давления цитоплазмы клеток на снижение скорости испарения воды, заканчивая формированием “корки” — слоя высохших клеток на поверхности тканей, препятствующей испарению воды, или в целом сокращение площади испарения.

Поскольку результаты измерений фракций воды у тканей клубня картофеля, получаемые методом сушки, могут зависеть от выше описанных факторов, оценку связи между осмотическим давлением цитоплазмы клеток и количеством связанной воды в тканях проводили на основании метода ДСК. Результаты калориметрических измерений не позволяют однозначно сказать о существовании четкой связи между осмотическим давлением и количеством связанной воды в тканях растений. Так, при осмотическом давлении в клубне картофеля $P \geq 24$ атм содержание связанной воды составляло 16%, в то же время содержание связанной воды в листе проростка пшеницы с осмотическим давлением $P \geq 11$ атм было всего на 3% меньше.

Дополнительно были проведены измерения количества водных фракций в тканях клубня картофеля и листа проростка пшеницы до и после сушки над серной кислотой с использованием метода ДСК.

Было установлено, что после суток нахождения тканей клубня картофеля в эксикаторе над серной кислотой их оводненность снизилась в 1.3 раза (табл. 3). Уменьшение оводненности тканей клубня картофеля было связано с убылью воды как из фракций свободной, так из фракции связанной воды. Необходимо отметить, что количество убывшей связанной воды (0.5 мг/мг сухой массы) почти не уступало количеству убывшей свободной воды (0.7 мг/мг сухой массы). Иная зависимость потери влаги выявлена у листа проростка пшеницы. Несмотря на уменьшение оводненности тканей листа в 1.5 раза, снижение было вызвано испарением свободной воды, в то время как количество связанной воды значимо не изменилось, а ее отношение к общему водосодержанию вполне закономерно возросло (табл. 3).

Выявленное изменение количества связанной воды в клубне картофеля после его высушивания над серной кислотой, по нашему мнению, может быть обусловлено содержанием значительного количества крахмала, гидрофильные группы которого адсорбируют воду. Известно, что сорбируемые в зернах крахмала молекулы воды находятся в трех состояниях: свободные, первично адсорбированные (сильно связанные) и вторично адсорбированные; при этом, доля связанной воды в нативных зернах крахмала не зависит от степени их гидратации (Угрозов и др., 2008; Белопольская и др., 2012). Можно полагать, что обнаруженное методом ДСК разное количество связанной воды в тканях клубня картофеля в исходном состоянии и после сушки над водоотнимающей средой, связано с убылью вторично связанной воды из кол-

Таблица 3. Оводненность, доля свободной и связанной воды в тканях листа проростка пшеницы и клубня картофеля (по данным дифференциальной сканирующей калориметрии)

мг H ₂ O/мг сухой массы	Клубень картофеля		Лист пшеницы	
	исходное состояние	после сушки над конц. H ₂ SO ₄	исходное состояние	после сушки над конц. H ₂ SO ₄
Оводненность	4.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2*	6.5 ± 0.9	4.2 ± 0.9*
Свободная вода	3.6 ± 0.2	2.9 ± 0.2*	5.8 ± 0.8	3.3 ± 0.6*
Связанная вода	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1*	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2

лоидов. По-видимому, в данном случае применение метода ДСК имеет ограничения при исследовании: фракции молекул воды, степень связи которых с субстратом одновременно не позволяет им выстраивать кристаллическую решетку льда при понижении температуры, но и не препятствует их перемещению вдоль градиента концентрации паров при высушивании.

В целом, несмотря на существующие разногласия в получаемых данных, нельзя говорить о неприменимости какого-либо из методов для количественной оценки связанной и свободной воды в тканях растений. Следует полагать, что для корректной интерпретации полученных результатов как при использовании метода высушивания над концентрированной серной кислотой, так и метода промораживания с применением ДСК, необходимо учитывать физиологические и структурные особенности изучаемого объекта.

Использование метода высушивания в воздушной среде с низким содержанием паров воды применительно к запасующим тканям, таким как запасающая паренхима клубня картофеля, необходимо учитывать как высокое содержание осмотов, так и возможное влияние на скорость испарения воды повышения плотности подсыхающей ткани. Эффект торможения испарения влаги вследствие повышения плотности ткани можно снизить, если максимально диспергировать материал, однако полностью его исключить по-видимому нельзя. Применение метода ДСК позволяет наиболее полно оценить количество свободной и связанной воды в тканях растений, однако и этот метод имеет ограничения при изучении тканей с высоким содержанием сорбирующих воду молекул. Получаемые результаты о количестве связанной воды в данном случае могут быть завышены, что было показано на тканях клубня картофеля. Наименьшие разногласия между сравниваемыми методами по соотношению фракций воды были получены при использовании в качестве объекта исследования листа пшеницы. Сопоставимость данных, полученных разными методами при оценке фракций воды у листа пшеницы, может быть следствием как меньшего содержания осмо-

литов, так и большей проницаемостью его тканей для паров воды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для количественной оценки фракций свободной и связанной воды в растительных тканях необходимо внимательно подходить к подбору метода исследования изучаемого объекта. Для верной интерпретации полученных данных необходимо учитывать физиологические и структурные особенности изучаемого объекта. На результаты, получаемые методом высушивания над гигроскопичными средами, могут оказывать существенное влияние как концентрация осмотов в цитоплазме клеток, так и снижение физической проницаемости подсыхающей ткани для паров воды. Наиболее полно оценить количество свободной и связанной воды в тканях растений позволяет метод промораживания на дифференциальном сканирующем калориметре, однако и этот метод имеет ограничения при изучении тканей с высоким содержанием сорбирующих воду молекул.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках темы “Физиология и стресс-устойчивость фотосинтеза растений и пойкилогидрических фотоавтотрофов в условиях Севера” (№ ГР АААА-А17-117033010038-7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алаудинова Е.В., Симкина С.Ю., Миронов П.В. Сезонные изменения содержания воды в меристематических тканях почек *Picea obovata* L. и *Pinus sylves-*

- tris* L. и ее распределение в клетках // Хвойные бореальной зоны. 2007. Т. 24. № 4–5. С. 487–491.
- Алексеев А.М.* Водный режим клеток растения в связи с обменом веществ и структурированностью цитоплазмы. М.: Наука, 1969. 36 с.
- Бакрадзе Н.Г.* О кристаллизации внутриклеточной воды в тканях растений // Биофизика. 1983. Т. 28. С. 119–121.
- Белопольская Т.В., Церетели Г.И., Грунина Н.А., Родригес Кастильо Л.О.* Тепловые свойства водных кластеров в нативных и аморфных крахмалах // Вестн. СПбГУ. 2012. Сер. 4. Вып. 2. С. 10–21.
- Викторов Д.П.* Малый практикум по физиологии растений / Учеб. пособие для биол. спец. вузов, 3-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1983. 135 с.
- Гольд В.М., Гаевский Н.А., Голованова Т.И. и др.* Физиол. раст. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: метод. указания по лаб. работам. Красноярск: ИПК СФУ, 2008. 61 с.
- Гусев Н.А.* Состояние воды в растении. М.: Наука, 1974. 134 с.
- Думанский А.В.* Учение о коллоидах. М.—Л.: Госхимиздат., 1948. 418 с.
- Жолкевич В.Н., Гусев Н.А., Капля А.В. и др.* Водный обмен растений. М.: Наука, 1989. 256 с.
- Климов С.В.* Пути адаптации растений к низким температурам // Успехи соврем. биол. 2001. Т. 121. С. 3–22.
- Максимов Н.А.* Развитие учения о водном режиме и засухоустойчивости растений от К.А. Тимирязева до наших дней “Тимирязевские чтения”. М.: Изд-во АН СССР, 1944. 48 с.
- Миронов П.В., Левин Е.Д.* Переохлаждение и обезвоживание хвойных зачатков в зимующих почках лиственницы сибирской // Физиол. раст. 1985. Т. 32. № 4. С. 695–701.
- Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Лоскутов С.Р.* Низкотемпературная устойчивость тканей меристем почек хвойных: особенности распределения связанной воды в клетках // Хвойные бореальной зоны. 2017. Т. 35. № 1–2. С. 117–122.
- Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Репях С.М.* Низкотемпературная устойчивость живых тканей хвойных. Красноярск: СибГТУ, 2001. 221 с.
- Миронов П.В., Алаудинова Е.В., Шимова Ю.С., Симкина С.Ю.* Фракционный состав водорастворимых цитоплазматических белков меристем зимующих почек ели и пихты // Хвойные бореальной зоны. 2006. Т. 18. №2. С. 228–231.
- Некрасов Б.В.* Основы общей химии. М.: Химия, 1973. Т. 1. 656 с.
- Романова Т.Д.* Физико-химические свойства белков и активность дегидрогеназ в связи с состоянием воды в зимующих растениях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань: Казанский гос. ун-т им. В.И. Ульянова-Ленина, 1970. 16 с.
- Сулейманов И.Г.* Состояние и роль воды в растении. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1974. 181 с.
- Тарабрин В.П.* Водный режим и устойчивость древесных растений к промышленным загрязнениям. Газоустойчивость растений. Новосибирск: Наука, 1980. С. 18–29.
- Трунова Т.И.* Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
- Туманов И.И.* Физиологические основы зимостойкости культурных растений. Л.: Сельхозгиз, 1940. 367с.
- Угрозов В.В., Шебершинева Н.Н., Филиппов А.Н., Сидоренко Ю.И.* Сорбция и десорбция паров воды зернами нативного крахмала некоторых культур // Коллоид. журн. 2008. Т. 70. № 3. С. 402–407.
- Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений* / Ред. Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, Н.М. Макрушин. М.: Колос, 2000. 640 с.
- Физиология сельскохозяйственных растений в 12 томах. Физиология водообмена растений, устойчивость растительных организмов. Природа иммунитета* / Ред. Б.А. Рубин. М.: МГУ, 1967. Т. 3. С. 12.
- Фрацук Н.Ф.* Устройство для определения свободной и связанной воды в биологических тканях. Авторское свидетельство SU 1442186 А1. База патентов СССР. 1986. <http://patents.su>.
- Хохлова П.Л., Бочкарева М.А.* Водный обмен растений: итоги ЯМР-исследований // Уч. зап. Казанского гос. ун-та. Естественные науки. 2009. Т. 151. Кн. 4. С. 74–102.
- Яковец О.Г.* Фитофизиология стресса. Методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. Минск: БГУ, 2011. 50 с.
- Einhorn-Stoll U., Hatakeyama H., Hatakeyama T.* Influence of pectin modification on water binding properties // Food Hydrocolls. 2012. V. 27. Iss. 2. P. 494–502.
- Ciesla K., Rahier H., Zakrzewska-Trznadel G.* Interaction of water with the regenerated cellulose membrane studied by DSC // J. Therm. Anal. Calorim. 2004. V. 77. P. 279–293.
- Clegg L.S.* Intracellular water and the cytomatrix: some methods of study and current views // J. Cell Biol. 1984. V. 99. № 1. P. 167–171.
- Gliguem H., Ghorbel D., Grabielle-Madelmont C. et al.* Water behavior in processed cheese spreads. DSC and ESEM study // J. Therm. Anal. Calorim. 2009. V. 98. P. 73–82.
- Hatakeyama T., Ikeda Y., Hatakeyama H.* Effect of bound water on structural change of regenerated cellulose // Macromol. Chem. Phys. 1987. V. 188. Iss. 8. P. 1875–1884.
- Hatakeyama T., Inui Y., Iijima M., Hatakeyama H.* Bound water restrained by nanocellulose fibres // J. Therm. Anal. Calorim. 2013. V. 113. P. 1019–1025.
- Nakamura K., Hatakeyama T., Hatakeyama H.* Studies on bound water of cellulose by differential scanning calorimetry // Text. Res. J. 1981. V. 51. Iss. 9. P. 607–613.
- Nishioka N., Yoshimi S., Iwaguchi T., Kosai K.* Permeability through cellulose membranes grafted with vinyl monomers in homogeneous system II. States of water in acrylonitrile grafted cellulose membranes // Polym. J. 1984. V. 16. P. 877–885.
- Nowak P., Harańczyk H., Kijak P., Marzec M. et al.* Bound water behavior in *Cetraria aculeata* thalli during freezing // Polar Biol. 2018. V. 41. Iss. 5. P. 865–876.

- Papoian A. G., Ulander J., Eastwood M. P. et al.* Water in protein structure prediction // PNAS USA. 2004. V. 101. № 10. P. 3352–3357.
- Slovakova L., Matusikova I., Salaj J., Hudak J.* Effect of low temperatures on the structure of plant cells: structural, biochemical, and molecular aspects / Handbook of Plant and Crop Stress. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2011. P. 536–564.
- Simatos D., Faure M., Bonjour E., Couach M.* Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry in the study of water in foods // Water relations of foods / Ed. R. Duckworth. London, New York, San Francisco: Academic Press, 1974. P. 193–209.
- Tomaszewska-Gras J.* Detection of butter adulteration with water using differential scanning calorimetry // J. Therm. Anal. Calorim. 2011. V. 108. P. 433–438.

Definitions of Free and Bound Water in Plants, a Comparative Analysis of the Drying Method over a Dewatering Agent and Differential Scanning Calorimetry

R. V. Malyshev*

Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

**e-mail: malrus@ib.komisc.ru*

The article presents the results of a comparative study of two methods of drying over a water-removing medium and the DSC method. Measurements of the amount of free and bound water were performed in plant tissues with different osmotic pressure of the cytoplasm. The results of the comparison revealed a number of limitations for both methods. It is necessary to take into account the physiological and structural features of the object under study. The most complete estimation of the amount of free and bound water in plant tissues is possible by the method of freezing on a differential scanning calorimeter, but this method also has limitations when studying tissues with a high content of water-sorbing molecules.

Keywords: free water, bound water, dewatering agent, osmotic pressure, differential scanning calorimetry

УДК 577.171.53:597.2/.5

ФУНКЦИИ ИОНОЦИТОВ И ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ИОННОГО ОБМЕНА У РЫБ

© 2021 г. Н. Л. Рендаков*

Институт биологии — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

*e-mail: nlrend@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принята к публикации 20.10.2020 г.

Обобщены данные о функциях ионоцитов жабр и о воздействии гормонов на ионный обмен у рыб. Описаны ионоциты HR (клетки, богатые H^+ -АТФазой), NaR (клетки, богатые Na^+/K^+ -АТФазой), NCCC (клетки, экспрессирующие Na^+-Cl^- -котранспортеры), SLC26C (клетки, экспрессирующие транспортеры растворенных веществ SLC26) и KE (K^+ -экскретирующие клетки), обнаруженные у пресноводной рыбы данио-рерио. Приведены сведения о функциях каждого типа ионоцитов, а также об ионных переносчиках, характерных для них. Изложены современные данные о гормонах, оказывающих положительное и отрицательное воздействие на транспорт Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , H^+ и NH_4^+ через жабры. Приводятся нерешенные вопросы в области гормональной регуляции ионного обмена у рыб, а также очерчиваются перспективы дальнейших исследований.

Ключевые слова: гормоны, ионоциты, ионный обмен, осморегуляция

DOI: 10.31857/S0042132421020071

ВВЕДЕНИЕ

В ходе эволюции у позвоночных животных развились сложные механизмы ионной и осмотической регуляции, необходимые для поддержания водно-солевого обмена. У рыб ионо- и осморегуляция осуществляется жабрами, почками и кишечником, при этом основными осморегуляторными органами взрослых рыб считаются жабры: они непосредственно контактируют с внешней средой и обеспечивают большую часть трансэпителиального ионного обмена (Evans et al., 2005; Takei et al., 2014; Guh et al., 2015; Yan, Hwang, 2019). У эмбрионов и личинок костистых рыб, у которых жабры еще не развиты, функция ионного обмена реализуется эпителием кожи и желточного мешка (Hiroi, McCormick, 2012).

Ионный обмен осуществляется специализированными клетками — ионоцитами. Первоначально ионоциты были обнаружены в жабрах европейского угря (*Anguilla anguilla*) и были названы “клетками, секретирующими хлорид-ионы”, что отражало их функцию (Keys, Willmer, 1932). В дальнейшем у многих других костистых рыб эти клетки называли сначала хлоридными, а еще позднее — клетками, богатыми митохондриями (mitochondria-rich cells, MRC). В современной литературе используется термин “ионоциты”,

который более предпочтителен, поскольку эти клетки участвуют не только в секреции Cl^- , но и в других процессах. Так, они необходимы для поглощения ионов в пресной воде, для регуляции кислотно-щелочного равновесия и для экскреции аммония (Hiroi, McCormick, 2012).

Подавляющее большинство видов рыб являются стеногалинными, то есть живут либо в пресной, либо в морской воде и не способны переносить значительные изменения солености среды. Остальные рыбы (считается, что около 5% видов) — эвригалинные, они обладают физиологическими механизмами, которые позволяют им адаптироваться к широкому диапазону изменений солености водной среды (McCormick, 2001; Evans et al., 2005).

У морских, пресноводных и эвригалинных рыб регуляция ионного обмена существенно различается, поскольку эти рыбы сталкиваются с различным ионным составом и концентрацией ионов в водной среде.

Так, в пресной воде рыбы пассивно поглощают воду и теряют ионы солей. Чтобы противодействовать этому, они должны активно поглощать ионы (в основном, Na^+ и Cl^-) с помощью ионоцитов жаберного эпителия, которые оснащены для этого набором белков-переносчиков (ионных

каналов). Транспорту ионов способствует электрический градиент, создаваемый Na^+/K^+ -АТФазой (НКА), расположенной на базолатеральной мембране ионоцитов (Marshall, Grosell, 2006; Shaughnessy, McCormick, 2018).

В морской воде рыбы теряют воду и “нагружаются” ионами солей, поступающих в организм по градиенту концентрации. Для противодействия этому ионоциты жаберного эпителия морских рыб, а также эвригалинных рыб, оказавшихся в морской среде (например, при катадромной миграции), должны активно экскретировать ионы. Экскреция Cl^- происходит трансцеллюлярно, то есть ионы хлора проходят сквозь ионоциты жабр. При этом они сначала поступают из крови в ионоциты через базолатеральный $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -ко-транспортёр (NKCC), а затем выводятся наружу через апикальный канал трансмембранного регулятора кистозного фиброза (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR). Экскреция Na^+ происходит по электрическому градиенту, заданному ионами хлора, парацеллюлярно, то есть через межклеточные “протекающие” плотные контакты (“leaky” tight junctions) жаберного эпителия (McCormick, 2001; Evans et al., 2005; Takei et al., 2014; Shaughnessy, McCormick, 2018). Экскреция этих ионов в морской воде также в большой степени зависит от активности НКА.

Ионный обмен у морских рыб был изучен раньше, чем у пресноводных, что объясняется, по-видимому, тем, что механизмы транспорта ионов в пресной воде более разнообразны и осуществляются с участием большего количества разных типов клеток. Более высокое разнообразие ионоцитов у пресноводных рыб может быть связано с более высокой вариабельностью состава пресноводной среды по сравнению с морской (Marshall, 2002; Wilson, Laurent, 2002; Takei et al., 2014). Кроме того, предполагается, что предками рыб были морские протопозвоночные, которые затем многократно заселяли пресные и солоноватые водоёмы (Smith, 1932; Marshall, 2002; Evans et al., 2005; Ditrach, 2007; Dymowska et al., 2012). Когда в результате каких-либо геологических событий формируются новые пресные водоёмы, могут возникать и новые адаптации к данному местобитанию. Например, трехиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus*) имеет особенности, позволяющие этому виду рыб эволюционировать в сторону пресноводных форм. У колюшек такая эволюция может занимать несколько поколений, причем эти процессы происходили неоднократно на протяжении геологической истории пресноводных озёр (Marshall, Grosell, 2006). Низкие концентрации хлорида натрия и хлорида кальция в некоторых пресноводных водоёмах могут активировать совершенно иные наборы ионных переносчиков, не характерные для солёной и солоноватой воды,

что также увеличивает разнообразие механизмов ионного транспорта. По этим причинам понятно, что одна единственная модель работы транспорта ионов не сможет объяснить ионную регуляцию у всех пресноводных рыб (Marshall, Grosell, 2006).

Осморегуляторные механизмы проявляют наибольшую гибкость у эвригалинных и, в частности, диадромных (проходных) видов рыб, которые в ходе своего жизненного цикла испытывают чрезвычайные изменения солёности среды. Выживание этих рыб при перемещении между пресной и морской водой зависит от своевременного переключения функции ионоцитов жаберного эпителия, при котором поглощение ионов сменяется экскрецией соли или наоборот (McCormick, 2012; Takei et al., 2014; Shaughnessy, McCormick, 2018).

Эвригалинные виды рыб часто используются при изучении осморегуляции. Особенно это относится к двум группам мигрирующих рыб — анадромным лососевым и катадромным угревым. Для данных рыб характерны большие различия в механизмах ионного обмена и, особенно, в гормональной его регуляции (Takei et al., 2014). Среди других модельных видов в данной области исследований можно назвать таких эвригалинных рыб как тилапии (*Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus*), фундулюсы (*Fundulus heteroclitus*), паралихты (*Paralichthys olivaceus*), лавраки (*Dicentrarchus labrax*), оризии (*Oryzias latipes*) и ханосы (*Chanos chanos*).

В данном обзоре в основном обобщены сведения об ионоцитах и их гормональной регуляции у пресноводного вида данио-рерио (*Danio rerio*); кроме того, приведены некоторые данные об осморегуляции у эвригалинных рыб — японской оризии (*Oryzias latipes*), радужной форели (*Onco-rhynchus mykiss*) и некоторых других. Белки-переносчики ионов и механизмы ионного обмена у данио-рерио изучены детальнее, чем у других стеногалинных пресноводных видов. Это связано, в частности, с тем, что данио-рерио — классический модельный вид, у которого просеквенирован геном и наиболее полно изучены сигнальные пути пролиферации, дифференцировки и развития ионоцитов (Esaki et al., 2007, 2009; Guh, Hwang, 2017).

ТИПЫ И ФУНКЦИИ ИОНОЦИТОВ ДАНИО-РЕРИО И ЯПОНСКОЙ ОРИЗИИ

У пресноводных данио-рерио и японской оризии обнаружено несколько типов ионоцитов (Dymowska et al., 2012; Guh, Hwang, 2017; Yan, Hwang, 2019).

В жабрах и коже данио-рерио выявлено по меньшей мере 5 типов ионоцитов: 1) клетки, богатые H^+ -АТФазой (H^+ -ATPase rich, HR), 2) клетки,

Таблица 1. Характеристика ионоцитов и переносчиков ионов у пресноводной рыбы данио-рерио

Ионоциты	Расположение переносчика	Переносчики ионов	Функции ионоцитов	Источник
HR	Апикально	H ⁺ -АТФаза (НА)	Поглощение Na ⁺ и HCO ₃ ⁻ , экскреция H ⁺ и NH ₄ ⁺	Lin et al., 2006, 2008; Horng et al., 2007; Yan et al., 2007; Shih et al., 2008, 2012, 2013; Liao et al., 2009; Lee et al., 2011
		Na ⁺ /H ⁺ -обменник 3b (NHE3b)		
		Переносчик NH ₄ ⁺ резус-глико-протеин (Rhcg1)		
	Базолатерально	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ -обменник, или анионный обменник 1b (AE1b)		
		Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза (atp1a1a.5)		
	Апикально	Карбоангидраза CA15a		
	В цитозоле	Карбоангидраза CA2-подобная a		
NaR	Апикально	Эпителиальный Ca ²⁺ -канал (ECaC)	Поглощение Ca ²⁺	Pan et al., 2005; Liao et al., 2009
	Базолатерально	Ca ²⁺ -АТФаза 2 плазматической мембраны (PMCA2)		
		Na ⁺ /Ca ²⁺ -обменник 1b (NCX1b)		
		NKA (atp1a1a.1)		
NCCC	Апикально	Na ⁺ -Cl ⁻ -котранспортер 2b (NCC2b), он же NCC-like 2 и SLC12A10.2	Поглощение Na ⁺ и Cl ⁻	Liao et al., 2009; Wang et al., 2009, 2015; Lee et al., 2011
	Базолатерально	Cl ⁻ -канал 2c (CLC2c)		
		Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ -котранспортер 1b (NBCe1b)		
		NKA (atp1a1a.2)		
SLC26C	Апикально	Транспортеры растворенных веществ 26 SLC26A3 и SLC26A4	Экскреция HCO ₃ ⁻ и поглощение Cl ⁻	Bayaa et al., 2009; Perry et al., 2009
	Базолатерально	NKA (atp1a1a.1)		
KE	Апикально	K ⁺ -канал (Kir1.1)	Экскреция K ⁺	Abbas et al., 2011

богатые Na⁺/K⁺-АТФазой (Na⁺/K⁺-ATPase rich, NaR), 3) клетки, экспрессирующие Na⁺-Cl⁻-котранспортеры (Na⁺-Cl⁻-cotransporter cells, NCCC), 4) клетки, экспрессирующие транспортеры растворенных веществ 26 (solute carrier 26 cells, SLC26C) и 5) K⁺-экскретирующие клетки (KE) (Guh, Hwang, 2017; Yan, Hwang, 2019). Функции ионоцитов данио-рерио и локализация ионных переносчиков в них представлены в табл. 1.

Роль транспортера NBCe1 (переносчика HCO₃⁻) в регуляции кислотно-щелочного равновесия неизвестна. В клетках SLC26C не идентифицированы никакие другие переносчики, кроме SLC26 и NKA. Кроме того, отсутствует информация о каких-либо переносчиках, кроме Kir1.1, в клетках KE, а также неизвестно физиологическое значение экскреции K⁺ (Guh, Hwang, 2017).

У эвригалинной японской оризии, обитающей в пресной воде, имеются следующие ионоциты: 1) клетки-обменники ионов натрия и водорода (Na⁺/H⁺-exchanger cells, NHEC), 2) клетки с эпителиальными Ca²⁺-каналами (ECaC-expressing cells, ECaCC), 3) NCCC и 4) клетки HR. Клетки NHEC обеспечивают экскрецию H⁺, NH₄⁺ и K⁺, а также поглощение Na⁺. Ионоциты ECaCC отвечают за поглощение Ca²⁺, а NCCC — за поглощение Na⁺ и Cl⁻. Функция ионоцитов HR у пресноводной оризии не установлена (Yan, Hwang, 2019).

У оризии, акклимизированной к морской воде, обнаружены ионоциты типа SW (от англ. sea water — морская вода), а также добавочные клетки (accessory cells, AC). Такой набор ионоцитов характерен для рыб, обитающих в морской среде, и у оризии они функционируют типичным для морских рыб

образом. Так, ионоциты SW осуществляют экскрецию H^+ , NH_4^+ , K^+ , Na^+ и Cl^- . Экскреция Na^+ происходит парацеллюлярным путем, через межклеточное пространство между ионоцитами и добавочными клетками. Функция клеток AC полностью пока не раскрыта (Yan, Hwang, 2019).

Считается, что ионоциты жабр у рыб (а также кожи рыбных эмбрионов) и клетки почечных канальцев у млекопитающих обладают большим сходством в механизмах ионного транспорта и в структуре транспортных белков (Yan, Hwang, 2019). Например, клетки HR данио-рерио и клетки NHE3 японской оризии подобны клеткам проксимальных отделов почечных канальцев и вставочным α -клеткам собирательных трубочек почек млекопитающих, поскольку они так же осуществляют поглощение Na^+ и экскрецию H^+ и NH_4^+ . Кроме того, клетки NCCC данио-рерио и японской оризии подобны клеткам дистальных извитых канальцев млекопитающих, поскольку они аналогичным образом поглощают Na^+ и Cl^- , а клетки NaR данио-рерио и ECaC-клетки оризии проявляют сходство с клетками почек млекопитающих в способности осуществлять поглощение (или реабсорбцию) Ca^{2+} .

Таким образом, ионоциты данио-рерио и японской оризии изучены довольно подробно, и хотя не все их функции в настоящее время раскрыты, можно утверждать, что данные виды рыб успешно используются при изучении эпителиального транспорта ионов и его регуляции.

ХАРАКТЕРИСТИКА ИОНОЦИТОВ ДАНИО-РЕРИО

Ионоциты, богатые H^+ -АТФазой

Ионоциты HR содержат апикально локализованную H^+ -АТФазу. Первоначально они были идентифицированы в коже эмбрионов и жабрах взрослых рыб как клетки, наиболее активно экскретирующие кислоту (точнее, кислотные эквиваленты, то есть протоны) (Lin et al., 2006; Hwang et al., 2007; Hwang, Chou, 2013). На апикальной мембране этих ионоцитов колокализуются также NHE3b и Rhcg1 (переносчик NH_4^+). Базолатерально расположены AE1b и $\alpha 1$ -субъединицы NKA (atp1a1a.5). В этих клетках идентифицированы также две карбоангидразы — мембраносвязанная апикальная карбоангидраза CA15a и цитозольная CA2-подобная карбоангидраза α (Esaki et al., 2007; Yan et al., 2007; Lin et al., 2008; Shih et al., 2008; Liao et al., 2009; Lee et al., 2011; Hwang, Chou, 2013).

Ионоциты типа HR данио-рерио аналогичны по механизмам транспорта и экспрессии белков-переносчиков клеткам проксимальных почечных

канальцев и вставочным клеткам почек (типа A) (Hwang, Chou, 2013). Учитывая это, клетки кожи эмбрионов данио-рерио могут оказаться полезной альтернативной моделью при изучении транспорта ионов в почках других позвоночных, в том числе и человека (Hwang, Chou, 2013).

Экскрецию H^+ через апикальную мембрану клеток HR у данио-рерио обеспечивают два переносчика — NA и NHE3b. Эксперименты показали, что NA играет более важную роль в экскреции кислотных эквивалентов, чем NHE3b (Shih et al., 2012; Hwang, Chou, 2013).

В отличие от млекопитающих, которые экскретируют мочевины как основной побочный продукт азотного обмена, костистые рыбы являются в основном аммонителами, то есть они экскретируют азот главным образом в виде аммония. Поскольку костистые рыбы могут экскретировать NH_4^+ непосредственно в окружающую воду, им не требуется затрачивать энергию на превращение NH_4^+ в менее токсичную мочевины. Возможно, что жаберы рыб экскретируют не ионы NH_4^+ , а газ NH_3 , что предполагается в исследованиях по связыванию кислотных эквивалентов в составе NH_4^+ . При этом закисление слоя воды, прилегающего к жабрам, облегчает экскрецию NH_4^+ (Wright et al., 1989). Показано также, что сопряженная работа NHE3 и Rhcg1 не только опосредует связывание кислотных эквивалентов в составе экскретируемого NH_4^+ , но и необходима для поглощения ионоцитами Na^+ (Wu et al., 2010; Hwang, Chou, 2013).

Поглощение Na^+ и HCO_3^- ионоцитами HR требует наличия карбоангидраз и других базолатеральных переносчиков, что роднит их с клетками проксимальных канальцев и собирательных трубочек в почках млекопитающих (Hwang, Chou, 2013).

Ионоциты, богатые NKA

Отличие ионоцитов NaR от ионоцитов HR первоначально было продемонстрировано путем мечения кожи эмбрионов данио-рерио моноклональными антителами к α -субъединице NKA (Liao et al., 2007; Hwang, Chou, 2013). Апикально на мембране этих ионоцитов расположены каналы ECaC, базолатерально — PMCA, NCX и NKA (изоформа atp1a1a.1) (Hwang, Chou, 2013).

У данио-рерио идентифицированы шесть изоформ PMCA и семь изоформ NCX, из которых только PMCA2 и NCX1b колокализуются в клетках NaR (Liao et al., 2007). Кроме того, из шести генов $\alpha 1$ -субъединицы NKA в клетках NaR экспрессируется только atp1a1a.1 (Liao et al., 2009).

Набор переносчиков Ca^{2+} в клетках NaR данио-рерио подобен таковому в Ca^{2+} -поглощающих клетках почек и кишечника млекопитающих (Hoenderop et al., 2005). У млекопитающих поглощение кальция через апикальные мембраны тесно связано с TRPV5/6 (ортологи ECaC данио-рерио), NCX1 и PMCA1b. Транспорт Ca^{2+} через переносчик TRPV6 является скоростью-лимитирующим этапом в витамин D-зависимом поглощении Ca^{2+} (Hoenderop et al., 2005; Hwang, Chou, 2013).

Акклимация данио-рерио к среде с низким содержанием Ca^{2+} , которая, как известно, приводит к стимуляции поглощения Ca^{2+} (Pan et al., 2005), увеличивает также и экспрессию мРНК *ecac* (Liao et al., 2007). Кроме того, экспрессия *ecac*, но не *pmca2* и *ncx1b*, зависит от воздействия гормонов, таких как станниокальцин (Tseng et al., 2009), кортизол (Lin et al., 2011) и витамин D (Lin et al., 2012). В целом, данные литературы показывают, что регуляция трансэпителиального поглощения Ca^{2+} путем воздействия на ECaC проявляет консервативные свойства в филогенетическом ряду от рыб до млекопитающих (Hwang, Chou, 2013).

Ионоциты, экспрессирующие Na^+ - Cl^- -котранспортеры

Показано, что котранспортер NCC2b (он же NCC-like 2 или SLC12A10.2) локализован у данио-рерио на апикальной мембране в отдельной группе ионоцитов, отличной от идентифицированных ранее клеток HR и NaR. Данные ионоциты были признаны аналогичными клеткам дистальных извитых канальцев почек млекопитающих, которые также экспрессируют Na^+ - Cl^- -котранспортеры и участвуют в поглощении Na^+ и Cl^- (Wang et al., 2009; Hwang, Chou, 2013).

Поглощение Na^+ у данио-рерио происходит главным образом за счет работы переносчика NHE3b (в ионоцитах HR), а NCC, по-видимому, играет в этом процессе минимальную или вспомогательную роль (Esaki et al., 2009; Hwang, Chou, 2013). Функциональная избыточность, связанная с участием в обмене Na^+ двух переносчиков — NHE3 и NCC, представляется консервативной от данио-рерио до млекопитающих. В проксимальных канальцах почек млекопитающих массовая реабсорбция Na^+ осуществляется с помощью переносчика NHE3, тогда как тонкая регуляция реабсорбции Na^+ достигается другими, избыточными механизмами, и в частности, с помощью NCC в дистальных извитых канальцах (Hwang, Chou, 2013).

Базолатерально в ионоцитах NCCC данио-рерио расположены переносчики ионов NKA (*atp1a1a.2*) и NBCe1b (Liao et al., 2009; Lee et al., 2011). Апикальный транспортер NCC переносит

Na^+ из окружающей среды в клетки, а базолатеральные NBCe1b и NKA (*atp1a1a.2*) могут направлять внутриклеточные ионы Na^+ из эпителиоцитов в кровоток, однако в литературе имеется недостаточно молекулярно-физиологических доказательств такой работы переносчиков (Hwang, Chou, 2013).

У данио-рерио экспрессируется также 12 генов хлоридных каналов семейства *clc* (Cl^- channel). Из них в жабрах и коже данио-рерио только ген *clc-2c* коэкспрессировался с геном *ncc2b* (экспрессия *ncc2b* является маркерным признаком ионоцитов NCCC). По-видимому, канал CLC-2c необходим для перемещения Cl^- из ионоцитов в кровь (Wang et al., 2015).

Ионоциты, экспрессирующие транспортеры растворенных веществ SLC26

В собирательных трубочках млекопитающих вставочные клетки типа В коэкспрессируют апикальный пендрин (SLC26A4) и базолатеральную НА, играя основную роль в экскреции HCO_3^- , что необходимо для поддержания кислотно-щелочного гомеостаза (Wagner et al., 2011). У данио-рерио были идентифицированы три представителя семейства SLC26, а именно SLC26A3, SLC26A4 и SLC26A6C (Bayaa et al., 2009; Perry et al., 2009). мРНК, кодирующая эти белки, а также сам белок SLC26A3, экспрессируются в определенных типах клеток в жабрах эмбрионов и взрослых особей, при этом небольшая часть (менее 10%) клеток, экспрессирующих SLC26A3, коэкспрессирует также базолатеральную NKA (*atp1a1a.1*) (Bayaa et al., 2009; Perry et al., 2009; Hwang, Chou, 2013).

Ионоциты, экскретирующие K^+

В одной из групп ионоцитов данио-рерио, отличной от ионоцитов HR, NaR и NCCC, была показана экспрессия $\alpha 1$ -субъединиц NKA подтипа *atp1a1a.4* (Liao et al., 2009). Оказалось, что вместе с *atp1a1a.4* в ионоцитах кожи эмбрионов данио-рерио колокализуется мРНК переносчика, ортологичного каналу Kir1.1 человека (Abbas et al., 2011). Kir1.1 является K^+ -каналом, ортологом ROMK-канала (renal outer medullary K^+ channel, то есть K^+ -канал мозгового вещества почек) млекопитающих (Abbas et al., 2011). Было показано, что потеря функции Kir1.1 приводит к транзиторной тахикардии с последующей брадикардией (Abbas et al., 2011), то есть к эффектам, наблюдаемым при гиперкалиемии у человека (Kahloon et al., 2005).

Хотя наличие калиевых токов в этих клетках доказано не было, ионоциты, экспрессирующие Kir1.1, получили название K^+ -секретирующих

Таблица 2. Гормоны и другие сигнальные вещества, регулирующие обмен некоторых ионов у данио-рерио

Ионы	Гормоны, повышающие уровень ионов в крови	Гормоны, снижающие уровень ионов в крови
Ca^{2+}	Паратгормон (PTH) Белок, родственный паратгормону (PTHrP) Кортизол Витамин D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) Пролактин Соматотропин Сероводород	Кальцитонин (СТ) Станниокальцин (STC-1) Витамин D ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)
Na^+	Кортизол Пролактин Ренин-ангиотензиновая система (РАС) Катехоламины	Сероводород
Cl^-	Пролактин	STC-1 Пептид, относящийся к гену кальцитонина (CGRP)
H^+	—	Кортизол Эндотелин 1 Рецептор α , родственный эстрогеновому рецептору (ERR α) STC-1

клеток (Abbas et al., 2011; Hwang, Chou, 2013). На наш взгляд, уместнее было бы называть эти клетки K^+ -экскретирующими, поскольку понятие “секреция” ассоциируется главным образом с железами внутренней и внешней секреции. В зарубежных работах для обозначения транспорта ионов из организма часто используют термин “секреция”, а об экскреции говорят лишь в случае выделения каких-либо продуктов обмена веществ, например, в случае выделения ионов NH_4^+ (Hwang, Chou, 2013).

РОЛЬ ГОРМОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ИОННОГО ОБМЕНА РЫБ

Изменения окружающей среды быстро воздействуют на ионный состав и осмотическое давление жидкостей организма у рыб, и для компенсации этих воздействий они должны быстро и эффективно регулировать трансэпителиальный перенос ионов. Поскольку нейроэндокринная система является главным посредником между сигналами внешней среды и физиологическими реакциями, она является наиболее важной частью осморегуляторных механизмов (Guh et al., 2015).

В гормональной регуляции ионного обмена можно выделить две группы процессов: 1) быстрая настройка, происходящая в течение минут или часов, за счет уже существующих ионоцитов

и белков-переносчиков и 2) долгосрочная регуляция, осуществляющаяся в течение часов или дней за счет изменений в количестве ионоцитов и в экспрессии переносчиков (Hwang, Chou, 2013). В процессах быстрой регуляции в основном участвуют гормоны, действующие через рецепторы плазматических мембран (например, адреналин), а в долгосрочной регуляции больше проявляется роль гормонов, воздействующих на транскрипцию в клеточном ядре (например, стероидных гормонов).

Для некоторых гормонов, классический механизм действия которых заключается в воздействии на генетический аппарат клетки, были показаны и неклассические, не геномные механизмы регуляции. Так, еще в середине XX в. было обнаружено, что стероиды могут оказывать быстрые негеномные эффекты (Duval et al., 1983), однако их детальное изучение началось лишь в последние десятилетия, в том числе и у рыб (Das et al., 2018).

В таблице 2 приведен список гормонов и других сигнальных молекул, которые регулируют ионный обмен у данио-рерио.

Гормональная регуляция поглощения Ca^{2+}

Известны следующие гормоны, принимающие участие в регуляции кальциевого обмена у данио-рерио: пролактин, соматотропин (гормон роста), паратгормон, белок, родственный парат-

гормону, кортизол, витамин D, кальцитонин и станниокальцин (Hoshijima, Hirose, 2007; Tseng et al., 2009; Lafont et al., 2011; Lin et al., 2011, 2012).

Некоторые из указанных гормонов могут оказывать положительное действие на уровень Ca^{2+} (то есть гиперкальциемическое, или кальциотропное), другие — отрицательное (гипокальциемическое).

К гиперкальциемическим гормонам относятся: пролактин, соматотропин, PTH, PTHrP и кортизол. Витамин D в зависимости от молекулярной формы может проявлять у рыб как гиперкальциемическое действие, так и противоположное (Fraser, 2017).

Хорошо известным фактом является то, что у эвригалинных рыб пролактин необходим для акклимации к пресной воде, а соматотропин — к морской (Manzon, 2002; Evans et al., 2005; Hwang, Chou, 2013). В исследовании, ставшем классическим, было показано, что гипофизэктомированные фундулы (*Fundulus heteroclitus*) могли выжить в пресной воде только в том случае, если они получали экзогенный пролактин (Pickford, Phillips, 1959). Последующие работы выявили, что выживание рыб в данном случае было связано со снижением потери ионов, а не со стимуляцией их поглощения (Potts, Evans, 1966). Позднее было показано, что инъекции пролактина восстанавливают осмоляльность плазмы крови у гипофизэктомированных канальных сомов (*Ictalurus punctatus*) в пресной воде (Evans et al., 2005).

Гиперкальциемическое действие пролактина тесно связано с его осморегуляторным действием. У эвригалинных костистых рыб перенос из морской воды в пресную приводит к значительному повышению уровня пролактина в плазме крови, что необходимо для ограничения потери Na^+ (Arakawa et al., 1993). Одновременно пролактин усиливает поглощение ионов Ca^{2+} из окружающей пресной воды, в которой содержание этих ионов ниже, чем в морской воде. Однако, если солевая нагрузка отсутствует, то изменение концентрации Ca^{2+} в окружающей среде у рыб, адаптированных либо только к пресной воде, либо только к морской, по-видимому, является менее эффективным стимулятором секреции пролактина (Arakawa et al., 1993; Wongdee, Charoenphandhu, 2013).

На угре (*Anguilla rostrata*), акклимированном к пресной воде, было продемонстрировано, что инъекция овечьего пролактина, а также гиперпролактинемия, вызванная трансплантацией гипофиза, значительно повышают концентрацию Ca^{2+} в плазме крови за счет повышения активности РМСА в жаберных эпителиоцитах (Flik et al., 1989a). У самцов тиляпии (*Oreochromis mossambicus*) 8-дневное введение пролактина увеличивало поступление Ca^{2+} в жабы при одновременном

уменьшении оттока этих ионов, что приводило к гиперкальциемии (Wongdee, Charoenphandhu, 2013).

При акклимации эмбрионов данио-рерио к разбавленной в 20 раз пресной воде (0.8 мкМ Ca^{2+}) наблюдалась стимуляция транскрипции генов, кодирующих пролактин, соматотропин и PTH. При добавлении к воде 16 мкМ CaCl_2 транскрипция указанных генов возвращалась к исходному уровню (Hoshijima, Hirose, 2007). Однако более детальная информация о роли пролактина и соматотропина в ионном гомеостазе у стеногалинной рыбки данио-рерио отсутствует (Hwang, Chou, 2013).

Работы о воздействии соматотропного гормона на кальциевый обмен у рыб немногочисленны. Показано, что у особей мозамбикской тиляпии (*Oreochromis mossambicus*), которым вводили соматотропин, уровень кальция в чешуе и костях был немного, но достоверно более низким, чем у контрольных рыб (Flik et al., 1993). У радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), на которую воздействовали гормоном роста, концентрация Ca^{2+} в плазме крови была выше, чем в контрольной группе (Zhu et al., 2013). Таким образом, соматотропин предположительно оказывает гиперкальциемический эффект, хотя количество видов рыб, на которых этот эффект изучался, весьма ограниченно (Hwang, Chou, 2013).

Паратиреоидный гормон (parathyroid hormone, PTH), или паратгормон, экспрессируется в паращитовидных железах высших позвоночных. У млекопитающих паратгормон функционирует как гиперкальциемический гормон, который может стимулировать реабсорбцию Ca^{2+} почками, воздействуя на экспрессию переносчика Ca^{2+} (Hoenderop et al., 2005; van Abel et al., 2005; Guh et al., 2015).

Предполагается, что паращитовидные железы млекопитающих эволюционно происходят из жаберной ткани рыб (Okabe, Graham, 2004). Эволюция паращитовидных желез избавила наземных позвоночных от необходимости поглощать Ca^{2+} из воды, позволив им регулировать уровень Ca^{2+} в сыворотке с помощью сигнального пути CaSR–PTH (CaSR — calcium-sensing receptor, кальций-чувствительный рецептор). Таким образом, паращитовидные железы могут быть одним из механизмов, обеспечивших возможность существования позвоночных в наземной среде (Okabe, Graham, 2004; Lin et al., 2014).

Паращитовидные железы у рыб, по-видимому, отсутствуют, однако у них были идентифицированы два паралога *Pth* — *Pth1* и *Pth2* (Gensure et al., 2004). Экспрессия генов *Pth* была зарегистрирована в нескольких тканях данио-рерио, среди которых жабы, мышцы и мозг (Okabe,

Graham, 2004; Lin et al., 2014). Уровень Ca^{2+} в сыворотке крови золотой рыбки (*Carassius auratus*) повышался после инъекции гетерологичного РТН1 (Suzuki et al., 2011). Такой же эффект наблюдался у данио-рерио (Lin et al., 2014; Guh et al., 2015; Guh, Hwang, 2017).

Кроме РТН, у ряда рыб был обнаружен другой представитель семейства РТН, а именно белок, родственник паратгормону (parathyroid hormone-related protein, РТНrP). Считается, что РТНrP сыграл ключевую роль в эволюции животных, что обусловлено значением этого белка в формировании легочных альвеол, необходимых наземным позвоночным для дыхания в воздушной среде (Abbink, Flik, 2007; Torday, 2013). РТНrP вырабатывается во многих тканях и оказывает широкий спектр физиологических действий внутриклеточно, паракринно и эндокринно. Ключевая роль РТНrP для нормальной жизнедеятельности была продемонстрирована на мышах с нокаутом гена *Pthrp* (или его рецептора), что приводило к смерти животных при рождении в связи с отсутствием у них альвеол (Guerreiro et al., 2007; Torday, 2013).

РТНrP — гормон с плейотропным действием, который оказывает среди прочих и гиперкальциемические эффекты. Так, воздействие N-концевого пептида (1–38)РТНrP приводило к дозозависимому усилению накопления Ca^{2+} у личинок золотистого спара (*Sparus aurata*) (Guerreiro et al., 2007; Guh, Hwang, 2017). РТНrP был открыт у человека в 1987 г. в связи с некоторыми формами рака, вызывающими повышение уровня Ca^{2+} в крови. Данное состояние получило название гуморальной раковой гиперкальциемии (humoral hypercalcemia of malignancy, ННМ) (Abbink, Flik, 2007). Гиперкальциемия, возникающая при неконтролируемой секреции РТНrP, является следствием резорбции костей и подавления экскреции Ca^{2+} с мочой, что наблюдается также при гиперпаратиреозе (Guerreiro et al., 2007).

Другим гормоном, оказывающим влияние на обмен Ca^{2+} , является кортизол. Было обнаружено, что в отличие от млекопитающих, у которых кортизол оказывает гипокальциемическое действие (Patschan et al., 2001), у рыб этот гормон действует как стимулятор поглощения Ca^{2+} . Еще в 1989 году было показано, что вода с низким содержанием Ca^{2+} может вызывать повышение уровня кортизола у пресноводной радужной форели (*Oncorhynchus mykiss gairdnerii*) (Flik, Perry, 1989). У этого же вида рыб воздействие экзогенного кортизола приводит к активации экспрессии мРНК и белка ЕСaС в жабрах (Shahsavarani, Perry, 2006).

У эмбрионов данио-рерио экзогенный кортизол вызывал усиление поглощения Ca^{2+} , а также экспрессии *esac*, но не влиял на экспрессию

мРНК таких переносчиков Ca^{2+} как *pmca2* и *ncx1b* (Lin et al., 2011; Hwang, Chou, 2013). При этом показано, что увеличение экспрессии *esac* и поглощения Ca^{2+} может быть заблокировано морфолиновым нокаутом рецепторов GR (глюкокортикоидных), но не MR (минералокортикоидных), что служит убедительным доказательством того, что воздействие кортизола на работу ионоцитов осуществляется в основном через сигнальный путь рецепторов GR (Lin et al., 2011; Hwang, Chou, 2013).

В связи с отсутствием у костистых рыб альдостеронсинтазы, необходимой для синтеза альдостерона, кортизол у них является основным кортикостероидом (Nelson, 2003). Кортизол может связываться как с GR, так и с MR, хотя и с различным сродством, при этом каждый из сигнальных путей оказывает различное воздействие на транскрипцию генов, кодирующих переносчики ионов в жабрах (Kiilerich et al., 2007). Различие в воздействии кортизола на обмен Ca^{2+} у наземных млекопитающих и у рыб может быть связано с различием в путях поглощения Ca^{2+} у этих групп животных (Hwang, Chou, 2013).

Кроме того, установлено, что сигнальный путь кортизол—GR регулирует экспрессию рецептора и фермента синтеза витамина D (Lin et al., 2011), что предполагает, что воздействие кортизола на поглощение Ca^{2+} может быть опосредовано другими факторами (Guh, Hwang, 2017).

Жизненно необходимым гормоном, регулирующим поглощение Ca^{2+} у млекопитающих, является витамин D. Комплексы витамина D_3 и рецептора витамина D (vitamin D receptor, VDR) могут усиливать экспрессию белков TRPV5 и TRPV6 (ортологов ЕСaС) млекопитающих посредством связывания с витамин D-чувствительными элементами (vitamin D response elements, VDRE) в промоторных областях генов кальциевых переносчиков. Именно таким образом комплекс витамин D_3 —VDR может активировать транскрипцию гена *esac* (он же *trpv5*) и, таким образом, ускорять поглощение Ca^{2+} (Hoenderop et al., 2005; Hwang, Chou, 2013). По этой причине данный сигнальный путь является важным регулятором кальциевого гомеостаза у млекопитающих. Гиперкальциемическое действие витамина D является консервативным и сохраняется от рыб до наземных позвоночных (Hwang, Chou, 2013). Однако, в отличие от наземных позвоночных, формой витамина D, содержащейся в максимальной концентрации в крови радужной форели, является не $25(\text{OH})\text{D}_3$, а $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Fraser, 2017).

У рыб, по-видимому, нет такой строгой специфичности распределения ферментов гидроксилирования витамина D_3 по органам, которая имеется у человека (Graff et al., 1999). Так, у радужной

форели (*Oncorhynchus mykiss gairdnerii*) (Hayes et al., 1986), атлантической трески (*Gadus morhua*) (Sundell et al., 1992), карпа (*Cyprinus carpio*) и азиатского паралихта (*Paralichthys olivaceus*) (Takeuchi, 1994) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ синтезируется в печени, а не в почках, как у млекопитающих. При этом у ряда рыб активность 1α -гидроксилазы, необходимой для синтеза данной формы гормона, обнаружена также и в почках (Graff et al., 1999; Fraser, 2018).

Имеются сведения о том, что биологическое действие гормона $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ проявляется только в пресной воде, а после перемещения эвригалинных рыб в морскую среду, где требуется не поглощение Ca^{2+} , а его экскреция, начинает действовать другая форма гормона с противоположной активностью – $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Fraser, 2017). Такое изменение в работе двух форм гормона опосредовано экспрессией их рецепторов, которая, предположительно, зависит от концентрации Ca^{2+} в окружающей среде (Fraser, 2017).

Введение витамина D вызывало увеличение уровня Ca^{2+} в плазме крови у трески (*Gadus morhua*) (Sundell et al., 1993), а также дозозависимую гиперкальцемию у карпа (*Cyprinus carpio*) (Swarup et al., 1991). Экзогенный витамин D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), так же, как и экзогенный кортизол, приводил к увеличению поглощения Ca^{2+} и экспрессии *esac* у эмбрионов данио-рерио, не оказывая при этом воздействия на экспрессию *pmca* и *ncx* (Lin et al., 2012; Hwang, Chou, 2013).

К гипокальциемическим гормонам относятся STC-1 и СТ.

Станниокальцин (stanniocalcin) секретируется тельцами Станниуса, небольшими эндокринными железами, прикрепленными к почкам костистых рыб (Wagner et al., 1986; Guh, Hwang, 2017). Показано, что STC-1 проявляет гипокальциемическое действие, которое заключается в подавлении поглощения Ca^{2+} (Wagner et al., 1986; Yan, Hwang, 2019). Гипокальциемическое действие STC-1 хорошо установлено у многих видов рыб (Yeung et al., 2012). У эмбрионов данио-рерио нокадаун гена *stc1* морфолиновыми олигонуклеотидами приводил к увеличению содержания Ca^{2+} , поглощения Ca^{2+} и экспрессии *esac*. Эти данные позволяют предполагать, что STC-1 данио-рерио подавляет экспрессию гена *esac*, что, в свою очередь, приводит к подавлению поглощения Ca^{2+} у рыб (Tseng et al., 2009; Yan, Hwang, 2019).

Хронический стресс, индуцированный дексаметазоном, вызывал снижение уровня Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} , а также понижал секрецию STC из телец Станниуса у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) (Pierson et al., 2004). Это может свидетельствовать о том, что STC-1 участвует в гомеостазе ионов, отличных от Ca^{2+} (Yan, Hwang, 2019).

Кальцитонин (calcitonin) – небольшой пептид (32 аминокислотных остатка), вырабатываемый у млекопитающих парафолликулярными С-клетками щитовидной железы (Baldisserotto, 2019). У костистых рыб СТ синтезируется в основном в ультимобранхиальной железе (Guh et al., 2015). Ультимобранхиальная железа происходит из последнего глоточного мешочка. Она гомологична С-клеткам щитовидной железы млекопитающих. В эмбриогенезе млекопитающих С-клетки входят в состав щитовидной железы как парафолликулярные клетки. У данио-рерио слияния С-клеток с щитовидной железой не происходит, и эти клетки остаются в виде отдельной ультимобранхиальной железы (Holden et al., 2013).

СТ считается гипокальциемическим гормоном рыб и млекопитающих (Evans et al., 2005; Guh et al., 2015). Было показано, что инъекция гомологичного или гетерологичного СТ вызывает гипокальциемические эффекты у разных видов рыб, среди которых скат-хвостокол (*Dasyatis akajei*) (Sasayama et al., 1992), обыкновенный карп (*Cyprinus carpio*) (Chakrabarti, Mukherjee, 1993) и золотая рыбка (*Carassius auratus*) (Sasayama et al., 1993). У эмбрионов данио-рерио, на которых воздействовали водой с высоким содержанием Ca^{2+} , экспрессия гена кальцитонина и его рецептора была повышена, тогда как экспрессия *esac* снижалась (Lafont et al., 2011). Некоторые результаты предполагают наличие двухфазного эффекта СТ. У эмбрионов данио-рерио опосредованное СТ снижение поглощения Ca^{2+} приводит к краткосрочной гипокальциемии. Это, в свою очередь, может активировать гиперкальциемические сигнальные пути, что приводит к компенсации дисбаланса кальциевого обмена при посредстве гиперкальциемических гормонов и различных переносчиков Ca^{2+} (Hwang, Chou, 2013). Таким образом, в работе кальциотропных и гипокальциемических гормонов могут проявляться “плюс-минус-взаимодействия”.

Гормональная регуляция поглощения Na^+ и Cl^-

У костистых рыб, обитающих в морской воде, осмотическая потеря воды уравнивается посредством заглатывания воды с последующим поглощением NaCl в кишечнике (Hickman Jr., 1968). Возникающая в результате этого солевая нагрузка добавляется к той, которая происходит за счет диффузионного проникновения соли через жабры. Суммарный солевой баланс восстанавливается за счет активной экскреции NaCl жаберным эпителием, поскольку отсутствие петли Генле в нефронах не позволяет рыбам продуцировать мочу более гиперосмотичную, чем плазма крови (Evans et al., 2005).

В пресной воде рыбы, напротив, должны активно поглощать Na^+ и Cl^- , поскольку осмоляльность плазмы крови в этих условиях выше осмоляльности среды (Edwards, Marshall, 2012). Обмен ионов натрия и хлора у пресноводных рыб регулируется такими сигнальными молекулами как кортизол, пролактин, катехоламины, сероводород, STC-1, пептиды CGRP, а также ренин-ангиотензиновой системой. Из этих факторов гипонатриемическим является сероводород, а гипохлоремическими – STC-1 и CGRP.

Кортизол считается переключателем водно-солевого обмена при перемещении рыб между морской и пресной средой (McCormick, 2001; Evans et al., 2005; Takei et al., 2014; Guh et al., 2015; Guh, Hwang, 2017). Вместе с тем роль кортизола в осморегуляции двойственна, поскольку у эвригалинных видов рыб он участвует в адаптации как к соленой, так и к пресной воде (McCormick, 2001). Для дифференцировки ионоцитов жабр по морскому типу необходимо совместное действие кортизола и соматотропина, по пресному – кортизола и пролактина (McCormick, 2001; Sakamoto, McCormick, 2006).

У данио-рерио кортизол участвует в регуляции поглощения Na^+ (Kumai et al., 2012a). Такая функция кортизола опосредована рецепторами GR, а не MR, что было показано как в фармакологических исследованиях, так и в экспериментах с нокдаун генов (Guh, Hwang, 2017).

С другой стороны, имеются доказательства того, что кортизол может подавлять потерю Na^+ , изменяя проницаемость эпителия. Воздействие экзогенного кортизола на личинок данио-рерио приводило к значительному увеличению экспрессии белков плотных контактов – окклюдина-а и клаудина-б, что сопровождалось снижением парацеллюлярной проницаемости при воздействии кислой среды (Kwong, Perry, 2013). Данные эффекты кортизола также опосредованы рецепторами GR, поскольку нокдаун рецепторов GR устранял воздействие кортизола на парацеллюлярную проницаемость. К тому же, у морфантов с отключенными GR воздействие кислой среды вызывало более выраженное увеличение парацеллюлярной проницаемости (и более значительную потерю Na^+ путем диффузии), чем у рыб в контрольной группе (Kwong, Perry, 2013).

Гормон гипофиза пролактин необходим для адаптации к пресной воде, однако механизмы воздействия пролактина на транспорт отдельных видов ионов долгое время не были раскрыты (Manzon, 2002; Sakamoto, McCormick, 2006; Breves et al., 2014; Guh et al., 2015).

На эвригалинной мозамбикской тилляпии (*Oreochromis mossambicus*) и на данио-рерио было показано, что в пресной воде пролактин стимулирует дифференцировку NCC-экспрессирующих

ионоцитов и, соответственно, экспрессию переносчиков NCC (Breves et al., 2014; Guh, Hwang, 2017). Учитывая, что у данио-рерио NCC является ключевым фактором, необходимым для поглощения не только Na^+ , но и Cl^- , эти данные позволяют предполагать, что пролактин влияет у рыб и на обмен Cl^- .

Значение пролактина для поглощения ионов было дополнительно подтверждено в исследованиях на личинках данио-рерио с нокаутом гена пролактина. В этих работах показано, что при адаптации к пресной воде пролактин играет ключевую роль в регуляции именно поглощения ионов, а не только осмолярности. В жаберной области тела личинок с нокаутом гена пролактина к пятому дню после оплодотворения снижалась экспрессия NCC2b и количество ионоцитов NCCC, что приводило к нарушению у этих мутантных рыб поглощения Na^+ и Cl^- на шестой день после оплодотворения (Guh, Hwang, 2017).

Хорошо известно значение системы ренин-ангиотензин II в усилении реабсорбции соли в почках млекопитающих (Guh et al., 2015). Имеются доказательства того, что данная гормональная система влияет на обмен ионов и у рыб. Так, показано, что компенсаторное усиление поглощения Na^+ у личинок данио-рерио при остром воздействии кислой или бедной ионами воды может быть частично заблокировано антагонистом рецептора ангиотензина II. Кроме того, нокдаун гена ренина предотвращает стимуляцию поглощения Na^+ после острого воздействия кислой или бедной ионами воды (Kumai et al., 2014). Действие PAC в данных условиях, по-видимому, не зависит от кортизола, поскольку ни RU486 (антагонист GR), ни нокдаун GR не влияли на стимуляцию поглощения Na^+ в этих условиях (Kumai et al., 2014; Guh, Hwang, 2017).

Катехоламины, высвобождаемые либо из нервных окончаний, либо из хромаффинных клеток (Reid et al., 1998), играют важную роль в ионной регуляции пресноводных рыб, воздействуя на α - и β -адренергические рецепторы (Evans et al., 2005; Guh et al., 2015). Показано, что катехоламины вносят вклад в поглощение Na^+ ионоцитами данио-рерио (Evans et al., 2005; Hwang, Chou, 2013). В частности, нокаут β -адренергических рецепторов специфическими морфолиновыми олигонуклеотидами приводил к нарушению поглощения Na^+ в кислой или бедной ионами воде (Kumai et al., 2012b).

Хотя большая часть исследований фокусирует внимание на гормональных механизмах, участвующих в стимуляции поглощения Na^+ и Cl^- , работы на данио-рерио позволили обнаружить отрицательную регуляцию поглощения соли у рыб. Было показано, что сероводород (H_2S), газ, игра-

ющий важную роль в регуляции кардиореспираторной функции и сенсинге кислорода, может стимулировать поглощение Ca^{2+} (Kwong, Perry, 2015). Кроме того, эта сигнальная молекула является отрицательным регулятором поглощения Na^+ . Так, добавление в подкисленную воду, в которой находились эмбрионы данио-рерио, сульфата натрия (гидролизующегося с образованием H_2S) приводило к значительному снижению поглощения Na^+ . Такой эффект не наблюдался у морфантов данио-рерио, у которых по причине нокаута *gcm2* отсутствуют ионоциты HR, и Na^+ поглощается в основном ионоцитами NCCC. Это позволяет предполагать, что H_2S воздействует на поглощение Na^+ через переносчики NHE3b, а не NCC2b (Guh, Hwang, 2017).

Относительно мало известно о гипохлоремических эффектах гормонов у рыб. Такие эффекты могут оказывать STC-1 и пептид CGRP.

Выше уже упоминалось о том, что станниокальцин подавляет поглощение Ca^{2+} . Дальнейшие исследования показали, что STC-1 оказывает более широкое действие на ионный обмен, не ограниченное воздействием только на обмен Ca^{2+} (Chou et al., 2015). Так, сверхэкспрессия STC-1 приводила к снижению экспрессии ECaC, NCC и HA с сопутствующим снижением содержания Ca^{2+} , Na^+ и Cl^- в организме, а также к уменьшению секреции H^+ . Нокаун гена *stc-1* вызывал обратные эффекты. Кроме того, увеличение экспрессии STC-1 вызывало снижение количества клеток-предшественников ионоцитов и зрелых ионоцитов в коже эмбрионов данио-рерио. Таким образом, STC-1 является отрицательным регулятором количества ионоцитов и соответствующим образом снижает их функциональную активность (Chou et al., 2015).

Другим регулятором поглощения Cl^- является пептид, относящийся к гену кальцитонина (calcitonin gene-related peptide, CGRP). CGRP — сплайс-вариант кальцитонина, но в отличие от последнего CGRP обладает не гипокальциемическим, а гипохлоремическим действием. Увеличение экспрессии CGRP у личинок данио-рерио приводило к снижению экспрессии NCC2b и к замедлению поглощения Cl^- , и наоборот. Данный эффект осуществляется через изменение количества клеток NCCC, поскольку нокаун *crlr1* (рецептора CGRP) приводил к увеличению плотности клеток, экспрессирующих NCC2b (Guh, Hwang, 2017).

Гормональная регуляция экскреции H^+

Сведения о гормональной регуляции кислотно-щелочного равновесия у рыб фрагментарны. В большинстве исследований по этой теме вни-

мание фокусируется на регуляции транспорта ионов при низких значениях pH (“кислотный стресс” в противоположность “щелочному”). Имеются сведения, что после воздействия подкисленной воды происходит повышение уровня таких гормонов, как кортизол (Kumai et al., 2012a), пролактин (Flik et al., 1989b), соматолактин (Kakizawa et al., 1996), эндотелин 1 (Guh et al., 2014) и ангиотензин II (Kumai et al., 2014).

Известно, что у рыб кортизол участвует в регуляции экскреции H^+ . Так, при хроническом введении кортизола в брюшную полость пресноводной радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) наблюдалось повышение активности HA, осуществляющей экскрецию H^+ в жабрах (Lin, Randall, 1993). Воздействие экзогенного кортизола приводило к усилению экскреции H^+ и увеличению экспрессии переносчиков, связанных с экскрецией H^+ , в оболочке желточного мешка эмбрионов данио-рерио (Lin et al., 2015). Кроме того, показано, что это усиление опосредовано главным образом рецепторами GR, а не MR и достигается не только за счет регуляции общего количества ионоцитов HR, но и за счет усиления работы отдельных ионоцитов HR (Lin et al., 2015; Guh, Hwang, 2017).

Воздействие кортизола приводит к увеличению количества ионоцитов (в том числе, клеток HR) через GR-зависимое увеличение экспрессии фактора Foxi3a (Cruz et al., 2013). Это предполагает, что кортизол влияет на секрецию H^+ , по крайней мере, частично, регулируя пролиферацию и дифференцировку ионоцитов HR (Cruz et al., 2013; Guh et al., 2015).

Эндотелины — это семейство из трех пептидов, состоящих из 21 аминокислотного остатка. К семейству относятся эндотелины 1, 2 и 3 (EDN1, EDN2 и EDN3), которые участвуют во множестве физиологических процессов, в частности, в регуляции тонуса сосудов и транспорта воды и ионов в почках (Kohan et al., 2011). EDN1 является регулятором секреции H^+ в почках млекопитающих (Wesson, 2011).

Сверхэкспрессия EDN1 приводит к усилению экскреции H^+ из кожи эмбрионов, тогда как нокаун рецептора эндотелина *ednraa* вызывает значительное снижение экскреции протонов, индуцированной EDN1 или закислением среды (Guh et al., 2014, 2015).

Рецептор α , родственник эстрогеновому рецептору (estrogen-related receptor α), — орфанный ядерный рецептор, который играет важную роль в адаптивных метаболических реакциях в условиях, сопровождающихся увеличением энергетических затрат, таких как воздействие холода, физическая нагрузка и голодание (Villena, Kralli, 2008). Важно, что метаболизм в этих условиях обычно

сопровождается усилением продукции органических кислот, которые могут угрожать кислотно-щелочному равновесию организма (Guh et al., 2016). Нокдаун гена *esrra*, продуктом которого является $ERR\alpha$, нарушает экскрецию H^+ как в организме в целом, так и в отдельных ионоцитах HR. Это сопровождается снижением количества клеток HR, а также снижением экспрессии генов, необходимых для экскреции H^+ и энергетического метаболизма (Guh et al., 2016). Таким образом, $ERR\alpha$ модулирует экскрецию H^+ , воздействуя на экспрессию переносчиков, дифференцировку ионоцитов и энергетический метаболизм (Guh, Hwang, 2017).

Еще одним регулятором экскреции H^+ является стanniокальцин. Сверхэкспрессия *STC-1* приводила к снижению экспрессии *HA* и к уменьшению секреции H^+ . Нокдаун гена *stc-1* вызывал обратные эффекты (Chou et al., 2015).

Гормональная регуляция экскреции NH_4^+ и мочевины

В отличие от млекопитающих, которые экскретируют в качестве конечного продукта азотного обмена мочевину, костистые рыбы в основном являются аммонiotеликами, то есть экскретируют азот главным образом в виде аммония. Поскольку костистые рыбы могут экскретировать NH_4^+ непосредственно в окружающую воду, им не требуется затрачивать энергию на превращение NH_4^+ в менее токсичную мочевину. Возможно также, что жабры рыб экскретируют не ионы NH_4^+ , а газ NH_3 , что предполагается в исследованиях по связыванию кислотных эквивалентов в составе NH_4^+ . При этом закисление слоя воды, прилегающего к жабрам, облегчает экскрецию NH_4^+ (Wright et al., 1989).

О гормональной регуляции экскреции NH_4^+ известно крайне мало (Wilkie, 2002). Поскольку аммиак и аммоний являются у рыб естественными конечными продуктами катаболизма белков (Wright, Wood, 2012), гормоны, стимулирующие такой катаболизм (например, кортизол), по-видимому, должны способствовать образованию аммония и, возможно, его экскреции.

Не все рыбы являются аммонiotеликами. Например, жабун (*Opsanus beta*) обладает полностью функциональным циклом орнитин–мочевина и является одной из немногих костистых рыб, которые, будучи взрослыми, могут выделять свои азотистые отходы в основном в виде мочевины (то есть является уреотеликом) (Fulton et al., 2017). В природе жабуны экскретируют азот в виде 50% мочевины и 50% аммиака. Выведение мочевины служит “химическим плащом”, частично маски-

рующим запах аммиака и защищающим от хищников (Barimo, 2004). В лабораторных условиях, при создании стрессующей среды (перенаселенность или ограничение подвижности) и повышении уровня кортизола, у жабуна может быть индуцирована почти 100%-ная уреотелия (Hopkins et al., 1995; Wood et al., 1997, 2001), что связано с активацией ферментов выработки мочевины (Hopkins, et al., 1995) и с увеличением в жабрах экспрессии белка-переносчика tUT, необходимого для облегченной диффузии мочевины (Walsh et al., 2000). Мочевина выделяется при этом через tUT отдельными импульсами, длящимися от одного до трех часов, один или два раза в день (Wood et al., 1995, 1997, 1998). Кроме того, кортизол участвует в регуляции пульсирующей экскреции мочевины, т.к. за два–четыре часа до импульса экскреции мочевины уровень кортизола в плазме крови понижается, затем происходит экскреция, и уровень кортизола быстро восстанавливается (Wood et al., 1997, 2001). Снижение уровня кортизола не индуцирует пульсирующую секрецию мочевины напрямую (Wood et al., 1997, 2001, 2003). Считается, что этот эффект опосредован серотонином и его рецептором (Wood et al., 2003; Fulton et al., 2017;).

Уреотеликами являются рыбы, адаптированные к жизни в щелочной среде с очень высокими значениями pH (Wilkie, Wood, 1996). Вполне возможно, что и у них продукция и секреция мочевины регулируются кортизолом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность существования рыб какого-либо вида в определенном диапазоне значений солености среды зависит от эффективности осморегуляторных механизмов и, в частности, от возможностей гормональной регуляции. Считается, что современные костистые рыбы произошли от морских протопозвоночных (Evans et al., 2005), которые затем многократно заселяли пресные и солоноватые водоемы (Smith, 1932; Marshall, 2002; Ditrach, 2007; Dymowska et al., 2012). Заселение пресных водоемов было бы невозможным без адаптивных перестроек эндокринной системы и эффекторных органов, осуществляющих осморегуляцию – жабр, кишечника и почек. Разнообразие ионоцитов жабр и регулирующих их гормонов у разных видов рыб может быть следствием именно неоднократного заселения пресных водоемов. Такому разнообразию, конечно, способствовала и полногеномная дупликация, произошедшая при формировании костистых рыб и обеспечившая необходимый для эволюции генетический материал.

На органном уровне существенной особенностью эндокринной системы рыб является отсутствие парашитовидных желез при наличии двух

дополнительных желез, отсутствующих у млекопитающих, а именно телец Станниуса и урофиза (Bentley, 2002). Урофиз расположен в каудальной части спинного мозга и вырабатывает два гормона, необходимых для жизни рыб в морской среде, — уротензин I и уротензин II. На нескольких видах морских рыб показано, что уротензин I стимулирует экскрецию Cl^- , а уротензин II — подавляет (Marshall, 2019). Детальное рассмотрение функции уротензинов выходит за рамки данного обзора, поскольку его темой является в основном регуляция ионного обмена в пресноводной среде.

Несмотря на разнообразие, многие системы ионной регуляции проявляют консерватизм. Консерватизм проявляется, во-первых, в сходстве белков-переносчиков, обеспечивающих транспорт ионов и в жабрах рыб, и в почках млекопитающих, включая человека. Во-вторых, довольно консервативны некоторые системы гормональной регуляции, например, структура и сигнальные пути паратгормона, кальцитонина, витамина D и их рецепторов.

Механизмы гормональной регуляции ионного обмена у рыб рассматриваются во многих обзорных статьях и монографиях (Bentley, 2002; Norris, Lopez, 2011; Dymowska et al., 2012; McCormick, 2012; Norris, Carr, 2013; Takei et al., 2014; Guh, Hwang, 2017; Baldisserotto, 2019; Yan, Hwang, 2019). Несмотря на столь активное изучение этих механизмов, остаются нерешенные вопросы. Так, имеются вопросы о двойственной роли кортизола, проявляющейся в адаптации рыб как к морской, так и к пресной воде. Кортизол — гормон стресса. Означает ли это, что стресс может способствовать адаптации к изменению солености среды? Проявляется ли это у всех рыб, в том числе у тех, которые претерпевают метаморфоз, связанный с нерестовой миграцией (лососевые, угревые)? Как это связано со стресс-реактивностью у разных видов рыб?

Известно также, что кортизол осуществляет как глюкокортикоидные, так и минералокортикоидные эффекты, причем и те, и другие эффекты осуществляются через глюкокортикоидные рецепторы (GR). До сих пор неясно, каков функциональный лиганд (лиганды) минералокортикоидных рецепторов (MR). Какова роль этих рецепторов? Одинакова ли она у рыб разных групп?

Механизм действия витамина D также является актуальной темой в исследованиях по биохимии рыб. Относительно этого гормона-витамина было много вопросов, часть из которых получила ответы лишь в последние годы. Откуда рыбы получают витамин D? Если для этого необходимо воздействие солнечного света, то как рыбы могут получить это воздействие, обитая на большой глубине под водой? Зачем у некоторых рыб накапливаются большие количества витамина D?

Как проявляется у рыб недостаточность витамина D?

Среди паракринных и аутокринных регуляторов в последние годы большое внимание уделяется так называемым газовым медиаторам, или газотрансмиттерам (gasotransmitters), к которым относятся, в частности, монооксид азота (NO), монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S). Возникают вопросы: передается ли воздействие таких сигнальных молекул от особи к особи, особенно у стайных рыб? Как эти молекулы взаимодействуют с промышленными загрязнителями? Насколько консервативны эффекты этих медиаторов?

Наличие большого количества регуляторов предполагает возможность пересечения их сигнальных путей (cross-talk). Примером пересечения сигнальных путей в механизмах осморегуляции является синергизм эффектов кортизола и соматотропина. Известно, что соматотропин увеличивает экспрессию рецепторов кортизола в жабрах данио-рерио, а также увеличивает чувствительность интерреналовой ткани почек к АКГТ. Однако взаимодействия возможны и между разными системами организма. Известно, что у млекопитающих глюкокортикоиды оказывают иммуносупрессивное действие. В какой степени эти эффекты проявляются у рыб разных экологических и систематических групп? Как это отражается на процессах осморегуляции?

Итак, механизмы регуляции ионного обмена рыб реализуются сложной системой ионоцитов, ионных каналов и гормонов, необходимых для их согласованной работы. Несмотря на значительные достижения биологии последних десятилетий, остаются многие вопросы, ответы на которые смогут быть получены в дальнейших исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 0218-2019-0076 (№ г.р. АААА-А17-117031710039-3).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Abbas L., Hajhashemi S., Stead L.F. et al. Functional and developmental expression of a zebrafish Kir1.1

- (ROMK) potassium channel homologue Kcnj1 // J. Physiol. 2011. V. 589. № 6. P. 1489–1503.
- Abbink W., Flik G. Parathyroid hormone-related protein in teleost fish // Gen. Comp. Endocrinol. 2007. V. 152. № 2–3. P. 243–251.
- Arakawa E., Hasegawa S., Kaneko T., Hirano T. Effects of changes in environmental calcium on prolactin secretion in Japanese eel, *Anguilla japonica* // J. Comp. Physiol. B. 1993. V. 163. №2. P. 99–106.
- Baldisserotto B. Fish osmoregulation / Eds B. Baldisserotto, J.M. Mancera Romero, B.G. Kapoor. Taylor & Francis Group: CRC Press, 2019. 540 p.
- Barimo J.F. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: ureotely and ammonia tolerance in early life stages of the gulf toadfish, *Opsanus beta* // J. Exp. Biol. 2004. V. 207. № 12. P. 2011–2020.
- Bayaa M., Vulesevic B., Esbaugh A. et al. The involvement of SLC26 anion transporters in chloride uptake in zebrafish (*Danio rerio*) larvae // J. Exp. Biol. 2009. V. 212. № 20. P. 3283–3295.
- Bentley P.J. The fishes // Endocrines and osmoregulation: a comparative account in vertebrates. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. P. 187–231.
- Breves J.P., McCormick S.D., Karlstrom R.O. Prolactin and teleost ionocytes: new insights into cellular and molecular targets of prolactin in vertebrate epithelia // Gen. Comp. Endocrinol. 2014. V. 203. P. 21–28.
- Chakrabarti P., Mukherjee D. Studies on the hypocalcemic actions of salmon calcitonin and ultimobranchial gland extracts in the freshwater teleost *Cyprinus carpio* // Gen. Comp. Endocrinol. 1993. V. 90. № 3. P. 267–273.
- Chou M.-Y., Lin C.-H., Chao P.-L. et al. Stanniocalcin-1 controls ion regulation functions of ion-transporting epithelium other than calcium balance // Int. J. Biol. Sci. 2015. V. 11. №2. P. 122–132.
- Cruz S.A., Chao P.-L., Hwang P.-P. Cortisol promotes differentiation of epidermal ionocytes through Foxi3 transcription factors in zebrafish (*Danio rerio*) // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2013. V. 164. № 1. P. 249–257.
- Das C., Thraya M., Vijayan M.M. Nongenomic cortisol signaling in fish // Gen. Comp. Endocrinol. 2018. V. 265. P. 121–127.
- Ditrich H. The origin of vertebrates: a hypothesis based on kidney development // Zool. J. Linn. Soc. 2007. V. 150. № 2. P. 435–441.
- Duval D., Durant S., Homo-Delarche F. Non-genomic effects of steroids interactions of steroid molecules with membrane structures and functions // Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr. 1983. V. 737. № 3–4. P. 409–442.
- Dymowska A.K., Hwang P.-P., Goss G.G. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill // Respir. Physiol. Neurobiol. 2012. V. 184. № 3. P. 282–292.
- Edwards S.L., Marshall W.S. Principles and patterns of osmoregulation and euryhalinity in fishes // Euryhaline fishes / Eds S.D. McCormick, A.P. Farrell, C.J. Brauner. V. 32. 2012. P. 1–44.
- Esaki M., Hoshijima K., Kobayashi S. et al. Visualization in zebrafish larvae of Na⁺ uptake in mitochondria-rich cells whose differentiation is dependent on foxi3a // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 292. № 1. P. R470–R480.
- Esaki M., Hoshijima K., Nakamura N. et al. Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H⁺-ATPase in the skin of zebrafish larvae // Dev. Biol. 2009. V. 329. № 1. P. 116–129.
- Evans D.H., Piermarini P.M., Choe K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste // Physiol. Rev. 2005. V. 85. № 1. P. 97–177.
- Flik G., Atsma W., Fenwick J.C. et al. Homologous recombinant growth hormone and calcium metabolism in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, adapted to fresh water // J. Exp. Biol. 1993. V. 185. № 1. P. 107–119.
- Flik G., Perry S.F. Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout // J. Endocrinol. 1989. V. 120. № 1. P. 75–82.
- Flik G., Fenwick J.C., Wendelaar Bonga S.E. Calcitropic actions of prolactin in freshwater North American eel (*Anguilla rostrata* LeSueur) // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 1989a. V. 257. № 1. P. R74–R79.
- Flik G., van der Velden J.A., Seegers H.C.M. et al. Prolactin cell activity and sodium fluxes in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) after long-term acclimation to acid water // Gen. Comp. Endocrinol. 1989b. V. 75. № 1. P. 39–45.
- Fraser D.R. Evolutionary biology: mysteries of vitamin D in fish // Vitamin D: Volume 1: Biochemistry, physiology and diagnostics. Elsevier: Academic Press, 2018. P. 13–27.
- Fulton J., LeMoine C.M.R., Bucking C. et al. A waterborne chemical cue from Gulf toadfish, *Opsanus beta*, prompts pulsatile urea excretion in conspecifics // Physiol. Behav. 2017. V. 171. P. 92–99.
- Gensure R.C., Ponugoti B., Gunes Y. et al. Identification and characterization of two parathyroid hormone-like molecules in zebrafish // Endocrinology. 2004. V. 145. № 4. P. 1634–1639.
- Graff L.E., Lie O., Aksnes L. In vitro hydroxylation of vitamin D₃ and 25-hydroxy vitamin D₃ in tissues of Atlantic salmon *Salmo salar*, Atlantic mackerel *Scomber scombrus*, Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and Atlantic cod *Gadus morhua* // Aquac. Nutr. 1999. V. 5. № 1. P. 23–32.
- Guerreiro P.M., Renfro J.L., Power D.M. et al. The parathyroid hormone family of peptides: structure, tissue distribution, regulation, and potential functional roles in calcium and phosphate balance in fish // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 292. № 2. P. R679–R696.
- Guh Y.-J., Hwang P.-P. Insights into molecular and cellular mechanisms of hormonal actions on fish ion regulation derived from the zebrafish model // Gen. Comp. Endocrinol. 2017. V. 251. P. 12–20.
- Guh Y.-J., Lin C.-H., Hwang P.-P. Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation // EXCLI J. 2015. V. 14. P. 627–659.
- Guh Y.-J., Tseng Y.-C., Yang C.-Y., Hwang P.-P. Endothelin-1 regulates H⁺-ATPase-dependent transepithelial H⁺ secretion in zebrafish // Endocrinology. 2014. V. 155. № 5. P. 1728–1737.

- Guh Y.-J., Yang C.-Y., Liu S.-T. et al. Oestrogen-related receptor α is required for transepithelial H^+ secretion in zebrafish // *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2016. V. 283. № 1825. P. 20152582.
- Hayes M.E., Guillard-Cumming D.F., Russell R.G.G., Henderson I.W. Metabolism of 25-hydroxycholecalciferol in a teleost fish, the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1986. V. 64. № 1. P. 143–150.
- Hickman Jr. C.P. Ingestion, intestinal absorption, and elimination of seawater and salts in the southern flounder, *Paralichthys lethostigma* // *Can. J. Zool.* 1968. V. 46. № 3. P. 457–466.
- Hiroi J., McCormick S.D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2012. V. 184. № 3. P. 257–268.
- Hoenderop J.G.J., Nilius B., Bindels R.J.M. Calcium absorption across epithelia // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. № 1. P. 373–422.
- Holden J.A., Layfield L.L., Matthews J.L. The zebrafish: atlas of macroscopic and microscopic anatomy. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2013. 147 p.
- Hopkins T.E., Wood C.M., Walsh P.J. Interactions of cortisol and nitrogen metabolism in the ureogenic gulf toadfish *Opsanus beta* // *J. Exp. Biol.* 1995. V. 198. № 10. P. 2229–2235.
- Horng J.-L., Lin L.-Y., Huang C.-J. et al. Knockdown of V-ATPase subunit A (atp6v1a) impairs acid secretion and ion balance in zebrafish (*Danio rerio*) // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2007. V. 292. № 5. P. R2068–R2076.
- Hoshijima K., Hirose S. Expression of endocrine genes in zebrafish larvae in response to environmental salinity // *J. Endocrinol.* 2007. V. 193. № 3. P. 481–491.
- Hwang P.-P., Chou M.-Y. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 2013. V. 465. № 9. P. 1233–1247.
- Kahloon M.U., Aslam A.K., Aslam A.F. et al. Hyperkalemia induced failure of atrial and ventricular pacemaker capture // *Int. J. Cardiol.* 2005. V. 105. № 2. P. 224–226.
- Kakizawa S., Kaneko T., Hirano T. Elevation of plasma somatolactin concentrations during acidosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *J. Exp. Biol.* 1996. V. 199. № 5. P. 1043–1051.
- Keys A., Willmer E.N. 'Chloride secreting cells' in the gills of fishes, with special reference to the common eel // *J. Physiol.* 1932. V. 76. № 3. P. 368–378.
- Kiilerich P., Kristiansen K., Madsen S.S. Cortisol regulation of ion transporter mRNA in Atlantic salmon gill and the effect of salinity on the signaling pathway // *J. Endocrinol.* 2007. V. 194. № 2. P. 417–427.
- Kohan D.E., Inscho E.W., Wesson D., Pollock D.M. Physiology of endothelin and the kidney // *Comprehensive physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. P. 883–919.
- Kumai Y., Bernier N.J., Perry S.F. Angiotensin-II promotes Na^+ uptake in larval zebrafish, *Danio rerio*, in acidic and ion-poor water // *J. Endocrinol.* 2014. V. 220. № 3. P. 195–205.
- Kumai Y., Nesan D., Vijayan M.M., Perry S.F. Cortisol regulates Na^+ uptake in zebrafish, *Danio rerio*, larvae via the glucocorticoid receptor // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012a. V. 364. № 1–2. P. 113–125.
- Kumai Y., Ward M.A.R., Perry S.F. β -Adrenergic regulation of Na^+ uptake by larval zebrafish *Danio rerio* in acidic and ion-poor environments // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2012. V. 303. № 10. P. R1031–R1041.
- Kwong R.W.M., Perry S.F. Cortisol regulates epithelial permeability and sodium losses in zebrafish exposed to acidic water // *J. Endocrinol.* 2013. V. 217. № 3. P. 253–264.
- Kwong R.W.M., Perry S.F. Hydrogen sulfide promotes calcium uptake in larval zebrafish // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2015. V. 309. № 1. P. C60–C69.
- Lafont A.-G., Wang Y.-F., Chen G.-D. et al. Involvement of calcitonin and its receptor in the control of calcium-regulating genes and calcium homeostasis in zebrafish (*Danio rerio*) // *J. Bone Miner. Res.* 2011. V. 26. № 5. P. 1072–1083.
- Lee Y.-C., Yan J.-J., Cruz S.A. et al. Anion exchanger 1b, but not sodium-bicarbonate cotransporter 1b, plays a role in transport functions of zebrafish H^+ -ATPase-rich cells // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2011. V. 300. № 2. P. C295–C307.
- Liao B.-K., Chen R.-D., Hwang P.-P. Expression regulation of Na^+ - K^+ -ATPase α 1-subunit subtypes in zebrafish gill ionocytes // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2009. V. 296. № 6. P. R1897–R1906.
- Liao B.-K., Deng A.-N., Chen S.-C. et al. Expression and water calcium dependence of calcium transporter isoforms in zebrafish gill mitochondrion-rich cells // *BMC Genomics*. 2007. V. 8. № 1. P. 354.
- Lin H., Randall D.J. H^+ -ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation // *J. Exp. Biol.* 1993. V. 180. № 1. P. 163–174.
- Lin L.-Y., Horng J.-L., Kunkel J.G., Hwang P.-P. Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2006. V. 290. № 2. P. C371–C378.
- Lin T.-Y., Liao B.-K., Horng J.-L. et al. Carbonic anhydrase 2-like a and 15a are involved in acid-base regulation and Na^+ uptake in zebrafish H^+ -ATPase-rich cells // *Am. J. Physiol. Physiol.* 2008. V. 294. № 5. P. C1250–C1260.
- Lin C.-H., Shih T.-H., Liu S.-T. et al. Cortisol regulates acid secretion of H^+ -ATPase-rich ionocytes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos // *Front. Physiol.* 2015. V. 6. P. 328.
- Lin C.-H., Su C.-H., Hwang P.-P. Calcium-sensing receptor mediates Ca^{2+} homeostasis by modulating expression of PTH and stanniocalcin // *Endocrinology*. 2014. V. 155. № 1. P. 56–67.
- Lin C.-H., Su C.-H., Tseng D.-Y. et al. Action of vitamin D and the receptor, VDR α , in calcium handling in zebrafish (*Danio rerio*) // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 9. P. e45650.
- Lin C.-H., Tsai I.-L., Su C.-H. et al. Reverse effect of mammalian hypocalcemic cortisol in fish: cortisol stimulates Ca^{2+} uptake via glucocorticoid receptor-mediated vitamin D $_3$ metabolism // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 8. P. e23689.

- Manzon L.A. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review // Gen. Comp. Endocrinol. 2002. V. 125. № 2. P. 291–310.
- Marshall W.S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis // J. Exp. Zool. 2002. V. 293. № 3. P. 264–283.
- Marshall W.S. Rapid regulation of ion transport in mitochondrion-rich cells // Fish osmoregulation. CRC Press: Science Publishers, 2019. P. 395–426.
- Marshall W.S., Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance // The physiology of fishes. Taylor & Francis Group: CRC Press, 2006. P. 177–230.
- McCormick S.D. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish // Am. Zool. 2001. V. 41. № 4. P. 781–794.
- McCormick S.D. Smolt physiology and endocrinology // Euryhaline fishes. Elsevier: Academic Press, 2012. P. 199–251.
- Nelson D.R. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution // Arch. Biochem. Biophys. 2003. V. 409. № 1. P. 18–24.
- Norris D.O., Carr J.A. Vertebrate endocrinology. Elsevier: Academic Press, 2013. 585 p.
- Norris D.O., Lopez K.H. Hormones and reproduction of vertebrates, Volume 1: Fishes. Elsevier: Academic Press, 2011. 288 p.
- Okabe M., Graham A. The origin of the parathyroid gland // PNAS USA. 2004. V. 101. № 51. P. 17716–17719.
- Pan T.-C., Liao B.-K., Huang C.-J. et al. Epithelial Ca^{2+} channel expression and Ca^{2+} uptake in developing zebrafish // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2005. V. 289. № 4. P. R1202–R1211.
- Patschan D., Loddenkemper K., Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis // Bone. 2001. V. 29. № 6. P. 498–505.
- Perry S.F., Vulesevic B., Grosell M., Bayaa M. Evidence that SLC26 anion transporters mediate branchial chloride uptake in adult zebrafish (*Danio rerio*) // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2009. V. 297. № 4. P. R988–R997.
- Pickford G.E., Phillips J.G. Prolactin, a factor in promoting survival of hypophysectomized killifish in fresh water // Science. 1959. V. 130. № 3373. P. 454–455.
- Pierson P.M., Lamers A., Flik G., Mayer-Gostan N. The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout // Gen. Comp. Endocrinol. 2004. V. 137. № 3. P. 263–271.
- Potts W.T.W., Evans D.H. The effects of hypophysectomy and bovine prolactin on salt fluxes in freshwater-adapted *Fundulus heteroclitus* // Biol. Bull. 1966. V. 131. № 2. P. 362–368.
- Reid S.G., Bernier N.J., Perry S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release // Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 1998. V. 120. № 1. P. 1–27.
- Sakamoto T., McCormick S.D. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation // Gen. Comp. Endocrinol. 2006. V. 147. № 1. P. 24–30.
- Sasayama Y., Suzuki N., Oguro C. et al. Calcitonin of the stingray: comparison of the hypocalcemic activity with other calcitonins // Gen. Comp. Endocrinol. 1992. V. 86. № 2. P. 269–274.
- Sasayama Y., Ukawa K.-I., Kai-Ya H. et al. Goldfish calcitonin: purification, characterization, and hypocalcemic potency // Gen. Comp. Endocrinol. 1993. V. 89. № 2. P. 189–194.
- Shahsavariani A., Perry S.F. Hormonal and environmental regulation of epithelial calcium channel in gill of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2006. V. 291. № 5. P. R1490–R1498.
- Shaughnessy C.A., McCormick S.D. Reduced thermal tolerance during salinity acclimation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) can be rescued by prior treatment with cortisol // J. Exp. Biol. 2018. V. 221. № 6. P. jeb169557.
- Shih T.-H., Horng J.-L., Hwang P.-P., Lin L.-Y. Ammonia excretion by the skin of zebrafish (*Danio rerio*) larvae // Am. J. Physiol. Physiol. 2008. V. 295. № 6. P. C1625–C1632.
- Shih T.-H., Horng J.-L., Lai Y.-T., Lin L.-Y. Rhcg1 and Rhbg mediate ammonia excretion by ionocytes and keratinocytes in the skin of zebrafish larvae: H^+ -ATPase-linked active ammonia excretion by ionocytes // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2013. V. 304. № 12. P. R1130–R1138.
- Shih T.-H., Horng J.-L., Liu S.-T. et al. Rhcg1 and NHE3b are involved in ammonium-dependent sodium uptake by zebrafish larvae acclimated to low-sodium water // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2012. V. 302. № 1. P. R84–R93.
- Smith H.W. Water regulation and its evolution in the fishes // Q. Rev. Biol. 1932. V. 7. № 1. P. 1–26.
- Sundell K., Bishop J.E., Björnsson B.T., Norman A.W. 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in the Atlantic cod: plasma levels, a plasma binding component, and organ distribution of a high affinity receptor // Endocrinology. 1992. V. 131. № 5. P. 2279–2286.
- Sundell K., Norman A.W., Björnsson B.T. 1,25(OH) $_2$ vitamin D_3 increases ionized plasma calcium concentrations in the immature Atlantic cod *Gadus morhua* // Gen. Comp. Endocrinol. 1993. V. 91. № 3. P. 344–351.
- Suzuki N., Danks J.A., Maruyama Y. et al. Parathyroid hormone 1 (1–34) acts on the scales and involves calcium metabolism in goldfish // Bone. 2011. V. 48. № 5. P. 1186–1193.
- Swarup K., Das V.K., Norman A.W. Dose-dependent vitamin D_3 and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -induced hypercalcemia and hyperphosphatemia in male cyprinoid *Cyprinus carpio* // Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol. 1991. V. 100. № 2. P. 445–447.
- Takei Y., Hiroi J., Takahashi H., Sakamoto T. Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2014. V. 307. № 7. P. R778–R792.
- Takeuchi A. Comparative studies on vitamin D in vertebrates, especially in fish // Vitamins (Japan). 1994. V. 68. P. 55–64.
- Torday J.S. Evolution and cell physiology. 1. Cell signaling is all of biology // Am. J. Physiol. Physiol. 2013. V. 305. № 7. P. C682–C689.
- Tseng D.-Y., Chou M.-Y., Tseng Y.-C. et al. Effects of stanniocalcin 1 on calcium uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryo // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2009. V. 296. № 3. P. R549–R557.
- van Abel M., Hoenderop J.G.J., van der Kemp A.W.C.M. et al. Coordinated control of renal Ca^{2+} transport proteins by parathyroid hormone // Kidney Int. 2005. V. 68. № 4. P. 1708–1721.

- Villena J.A., Kralli A. ERR α : a metabolic function for the oldest orphan // Trends Endocrinol. Metab. 2008. V. 19. № 8. P. 269–276.
- Wagner G.F., Hampong M., Park C.M., Copp D.H. Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius // Gen. Comp. Endocrinol. 1986. V. 63. № 3. P. 481–491.
- Wagner C.A., Mohebbi N., Capasso G., Geibel J.P. The anion exchanger pendrin (SLC26A4) and renal acid-base homeostasis // Cell. Physiol. Biochem. 2011. V. 28. № 3. P. 497–504.
- Walsh P.J., Heitz M.J., Campbell C.E. et al. Molecular characterization of a urea transporter in the gill of the gulf toadfish (*Opsanus beta*) // J. Exp. Biol. 2000. V. 203. № 15. P. 2357–2364.
- Wang Y.-F., Tseng Y.-C., Yan J.-J. et al. Role of SLC12A10.2, a Na-Cl cotransporter-like protein, in a Cl uptake mechanism in zebrafish (*Danio rerio*) // Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol. 2009. V. 296. № 5. P. R1650–R1660.
- Wang Y.-F., Yan J.-J., Tseng Y.-C. et al. Molecular physiology of an extra-renal Cl⁻ uptake mechanism for body fluid Cl⁻ homeostasis // Int. J. Biol. Sci. 2015. V. 11. № 10. P. 1190–1203.
- Wesson D.E. Endothelins and kidney acidification // Endothelin in renal physiology and disease. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers, 2011. P. 84–93.
- Wilkie M.P. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges // J. Exp. Zool. 2002. V. 293. № 3. P. 284–301.
- Wilkie M.P., Wood C.M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments // Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 1996. V. 113. № 4. P. 665–673.
- Wilson J.M., Laurent P. Fish gill morphology: inside out // J. Exp. Zool. 2002. V. 293. № 3. P. 192–213.
- Wongdee K., Charoenphandhu N. Regulation of epithelial calcium transport by prolactin: from fish to mammals // Gen. Comp. Endocrinol. 2013. V. 181. P. 235–240.
- Wood C., Hopkins T., Hogstrand C., Walsh P. Pulsatile urea excretion in the ureagenic toadfish *Opsanus beta*: an analysis of rates and routes // J. Exp. Biol. 1995. V. 198. № 8. P. 1729–1741.
- Wood C., Hopkins T., Walsh P. Pulsatile urea excretion in the toadfish (*Opsanus beta*) is due to a pulsatile excretion mechanism, not a pulsatile production mechanism // J. Exp. Biol. 1997. V. 200. № 6. P. 1039–1046.
- Wood C.M., Gilmour K.M., Perry S.F. et al. Pulsatile urea excretion in gulf toadfish (*Opsanus beta*): evidence for activation of a specific facilitated diffusion transport system // J. Exp. Biol. 1998. V. 201. № 6. P. 805–817.
- Wood C.M., McDonald M.D., Sundin L. et al. Pulsatile urea excretion in the gulf toadfish: mechanisms and controls // Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol. 2003. V. 136. № 4. P. 667–684.
- Wood C.M., Warne J.M., Wang Y. et al. Do circulating plasma AVT and/or cortisol levels control pulsatile urea excretion in the gulf toadfish (*Opsanus beta*)? // Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 2001. V. 129. № 4. P. 859–872.
- Wright P.A., Wood C.M. Seven things fish know about ammonia and we don't // Respir. Physiol. Neurobiol. 2012. V. 184. № 3. P. 231–240.
- Wright P.A., Randall D.J., Perry S.F. Fish gill water boundary layer: a site of linkage between carbon dioxide and ammonia excretion // J. Comp. Physiol. B. 1989. V. 158. № 6. P. 627–635.
- Wu S.-C., Horng J.-L., Liu S.-T. et al. Ammonium-dependent sodium uptake in mitochondrion-rich cells of medaka (*Oryzias latipes*) larvae // Am. J. Physiol. Physiol. 2010. V. 298. № 2. P. C237–C250.
- Yan J.-J., Chou M.-Y., Kaneko T., Hwang P.-P. Gene expression of Na⁺/H⁺ exchanger in zebrafish H⁺-ATPase-rich cells during acclimation to low-Na⁺ and acidic environments // Am. J. Physiol. Physiol. 2007. V. 293. № 6. P. C1814–C1823.
- Yan J.-J., Hwang P.-P. Novel discoveries in acid-base regulation and osmoregulation: a review of selected hormonal actions in zebrafish and medaka // Gen. Comp. Endocrinol. 2019. V. 277. P. 20–29.
- Yeung B.H.Y., Law A.Y.S., Wong C.K.C. Evolution and roles of stanniocalcin // Mol. Cell. Endocrinol. 2012. V. 349. № 2. P. 272–280.
- Zhu T., Zhang T., Wang Y. et al. Effects of growth hormone (GH) transgene and nutrition on growth and bone development in common carp // J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol. 2013. V. 319. № 8. P. 451–460.

Hormonal Regulation of Ion Exchange in Fish

N. L. Rendakov*

Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

**e-mail: nlrend@mail.ru*

Data on gill ionocyte functions and on effects of hormones on ion exchange in fish are summarized. Ionocytes HR (H⁺-ATPase-rich), NaR (Na⁺/K⁺-ATPase-rich), NCCC (Na⁺-Cl⁻-cotransporters expressing cells), SLC26C (solute carrier 26 expressing cells) and KE (K⁺-excreting cells) found in freshwater zebrafish are described. Information on the functions of each type of ionocytes, as well as on the ion transporters characteristic of them, is given. The current data on hormones that have positive and negative effects on Ca²⁺, Na⁺, Cl⁻, H⁺ and NH₄⁺ transport through the gills are presented. Unresolved issues in the field of hormonal regulation of ion exchange in fish are listed, and further research directions are outlined.

Keywords: hormones, ionocytes, ion exchange, osmoregulation

УДК 575:577.121.7:577.151.0:577.23:591.128.1:591.128.2:597:598:599:612.5

ГИПОТЕЗА О МЕХАНИЗМАХ ЭВОЛЮЦИОННОГО ПРОЦЕССА И ЕГО КАНАЛИЗАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ. ЧАСТЬ 2. НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭВОЛЮЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ПОЗВОНОЧНЫХ

© 2021 г. В. А. Черлин*

Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

**e-mail: cherlin51@mail.ru*

Поступила в редакцию 27.06.2020 г.

После доработки 14.07.2020 г.

Принята к публикации 14.09.2020 г.

Приводятся материалы, иллюстрирующие важные закономерности, подтверждающие, что значительная часть эволюционного развития позвоночных животных определяется в первую очередь внутренними свойствами и законами “строительного материала” феномена жизни, действующими на разных уровнях ее функциональной организации, начиная с самого элементарного — с эргомов. Эволюция позвоночных рассматривается как двуединый процесс. Он состоит из 1) энергетической оптимизации на наиболее глубоком уровне организации жизни — на уровне эргомов, приводящей к канализованному, ортогенетическому развитию морфофизиологической организации и появлению признаков, присущих прежде всего высоким таксонам (развитие от общего к частному, макроэволюция); 2) адаптации к условиям внешней среды групп, получившихся в результате первого процесса, дифференцирующихся до видов и родов (развитие от частного к общему, микроэволюция).

Ключевые слова: позвоночные животные, внутренние и внешние движущие силы эволюционного процесса, направленность эволюции, механизмы эволюции

DOI: 10.31857/S0042132421020046

ВВЕДЕНИЕ

В первой части статьи (Черлин, 2021) проводился анализ эволюционного происхождения эндотермии, доказывалась объективность принципа стабилизации высокой температуры тела в эволюции позвоночных.

Во второй части мы рассмотрим некоторые механизмы эволюционного процесса у позвоночных животных.

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ ЭВОЛЮЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Общие замечания и уровни организации жизни

Жизнь — глобальное явление, единая сложная функциональная система с дискретными составляющими. И меняется, эволюционирует она исключительно как единый организм. Изменения затрагивают все уровни ее организации от самого нижнего до верхнего, что необходимо учитывать, изучая процесс изменений системы, то есть нужно учитывать изменения на **всех** уровнях, снизу доверху, понимать принципы их связи. А для этого важно понимать, о каких уровнях вообще идет

речь, какой уровень можно считать нижним, и т.п.

В этой связи, думается, некорректно начинать рассмотрение проблемы эволюции с организменного или популяционного уровней. Начинать нужно с самого элементарного функционального уровня, с элементарной единицы жизни как функционального динамического процесса — с эргомов¹ (*sensu* А.М. Уголев, 1983, 1985). Без этого получается, что мы вообще не рассматриваем целый пласт важнейших закономерностей, который неминуемо и безусловно сильно влияет на весь процесс. Следовательно, только углубив начало рассмотрения процесса до уровня эргомов, возможно будет несколько по-новому увидеть и весь процесс в целом.

Именно поэтому проблема уровней организации жизни так важна при рассмотрении механизмов эволюционного процесса (Черлин, 2012).

Любая классификация базируется на какой-либо определенной основе — по цвету, по функ-

¹ Эргом — простейшая, стандартная биохимическая “машина”, исполняющая одну элементарную физиологическую функцию (Уголев, 1983, 1985).

ции, по размеру и т.п. Для каждой совокупности таких основ может быть много. Значит и вариантов классификации одной и той же совокупности тоже много.

Что же происходит при попытке классифицировать уровни организации проявления такого сложнейшего феномена, как жизнь?

Во-первых, как справедливо указывал В.Г. Афанасьев (1986), нельзя путать уровни организации жизни и уровни ее исследования. К сожалению, эта путаница чрезвычайно распространена. Так, в книге “Биологический энциклопедический словарь” (1986) в статье “Уровни организации живой материи” (с. 659–660) как раз и приводятся не “уровни организации”, а “уровни исследования” живой материи – биосферный, биогеоценотический или биоценотический, популяционно-видовой, организменный, органотканевый, клеточный, субклеточный или надмолекулярный, молекулярный.

Во-вторых, большинство авторов, занимавшихся этими вопросами, пытались свести воедино, в одну последовательность, в один ряд все (или почти все) варианты дифференциации. Так, К.М. Завадский (1961) выделяет пять уровней: организм, популяция, биоценоз, биогеографическая среда, биосфера. В.Г. Афанасьев (1986) различает шесть уровней: живая молекула (протоплазма), клетка, организм (особь), вид (популяция), биоценоз, биогеосфера. Есть и множество других, но в принципе сходных вариантов классификации.

Думается, что при подходе к этому вопросу следует четко проанализировать, что такое уровень организации как таковой. Вероятно, уровнем организации жизни можно считать такую совокупность явлений, которая обладает стойким своеобразием по признакам, на основе которых происходит разделение; является стабильным самостоятельным звеном в иерархии изучаемых явлений; в него входят структурными однотипными подразделениями разнокачественные элементы более элементарного уровня, а сам он входит структурным подразделением в состав более высокого уровня организации. Исходя из такого понимания сути дела, необходимо сделать ряд замечаний к некоторым схемам классификации, в которых, к сожалению, четко не выдерживается основа, по которой происходит классификация уровней.

Мы считаем, что, рассуждая об эволюции, необходимо изначально учитывать ряд аспектов, “параллельных линий”, “пластов” явлений и процессов, связанных с разными сторонами ее динамического существования.

Во-первых, жизнь – глобальный, планетарный (по меньшей мере) феномен. И поэтому рассматривать жизнь нужно как единую, сложную

функциональную систему, каковой она на самом деле и является. А раз так, то эволюция – облигатная форма ее существования, динамики, движения (Черлин, 2012).

Во-вторых, важнейшей формой существования жизни как функциональной системы является эволюция функций (Уголев, 1985).

В-третьих, нужно хотя бы в общих чертах представить себе основные направления морфофизиологической эволюции: 1) усложнение морфофизиологической структуры организмов, что еще в 1939 г. сформулировал А.Н. Северцов. А.А. Заварзин (1986) показал, что в процессе эволюции происходит усложнение морфофункциональных комплексов в основном за счет увеличения числа “вставочных звеньев”, делающее живую систему более надежной и более устойчивой. Это положение прекрасно проиллюстрировал своими конкретными исследованиями, в частности процессов пищеварения, А.М. Уголев (1983, 1985, и др.); одну из причин усложнения уровня организации проиллюстрировал В.А. Черлин (2012); 2) увеличение устойчивости живой системы в эволюции. Это частично связано с тем, что развитие всех направленных процессов (трансформация, становление, движение, течение) в природе осуществляется от менее устойчивых состояний к более устойчивым (Шишкин, 1988), а частично – с законом ортогенеза² Гааке–Эймера (Гааке, 1900; Naake, 1893; Eimer, 1897), утверждающим положение об инерционной устойчивости трендов однажды избранного направления филогенетического развития (Lull, 1936). Но при этом сам процесс эволюции происходит не по причине недостаточной устойчивости (“дрейфа” структуры организмов во времени – Матурана, Варела,

² Ортогенез (от греч. ὀρθός – прямой и γένεσις – возникновение), ортоэволюция – концепция в эволюционном учении, утверждающая, что развитие живой природы обусловлено внутренними факторами, направляющими ход эволюции по определенному пути. В основе представлений об ортогенезе лежат взгляды Т. Эймера (работы 1888–1897 гг.). Суть ортогенеза заключается в признании того, что направленность эволюции определяется изначально направленностью самой изменчивости и не является следствием естественного отбора. Все изменения живых форм – результат непосредственного воздействия внешней среды и происходят по немногим, строго определенным природой организма направлениям и затем передаются по наследству. В XX в. сторонники ортогенеза решающее значение в определении направленности эволюции все чаще придают внутренним факторам организма – либо нематериальным, либо материальным, но заложенным изначально в генетическом коде или в общих физико-химических особенностях. Ортогенез следует отличать от ортоселекции, при которой длительная направленность эволюции определяется направленностью естественного отбора, связанной с изменением условий среды в одном направлении. Концепция ортогенеза в принципе противоречит дарвиновскому учению, пытаясь объяснить эволюционные процессы большей частью автогенетическими причинами (Биологический..., 1986, с. 37).

2001; Капра, 2003), как это представлял себе, например, Л.Ш. Давиташвили (1948), а вопреки их устойчивости (Раутиан, 1993, 2006, с. 27). При этом, процесс постепенного усложнения морфофизиологической структуры организмов в эволюции, по нашему мнению, может иметь и другие обоснования (Черлин, 2012 и др.).

В-четвертых, при рассмотрении эволюции глобальной функциональной системы жизни нужно рассматривать динамику на разных уровнях функциональной организации ее дискретных функциональных единиц, как это отметил еще С.В. Мейен (1975).

По поводу структуры природы С.С. Шварц (1980) писал: “Структура природы оказывается в конечном итоге предельно простой: она определяется двумя системами интеграции – видовой и биогеоценотической” (с. 8). Тем не менее, биогеоценоз, биосфера или биогеографическая среда так же, как наш взгляд, не могут являться уровнями организации жизни, поскольку в эти понятийные конгломерации как равноправные компоненты входят и компоненты неживой природы (С.С. Шварц в предыдущей цитате, говоря о биогеоценотической системе интеграции, совершенно справедливо говорил о “структуре природы”, а не о структуре жизни, которую рассматриваем мы).

И вот здесь высветилась еще одна чрезвычайно важная сторона проблемы: уровни организации чего мы собираемся классифицировать? В разных литературных источниках то, что авторы хотят разобрать на уровни, называется по-разному: это уровни организации “материи”, “живой материи”, “природы”, “живой природы”, “жизни” и т.д. Мы здесь не беремся давать точные научные определения каждого из этих биологических явлений. Но...

Природа – совокупность естественных условий на Земле (поверхность, растительность, климат), органический и неорганический мир, все существующее на Земле, не созданное деятельностью человека (Ушаков, 2013).

Определений жизни – несметное количество. Разбираться в них мы сейчас не будем. Но общее понимание этого явления, важное в данном контексте (это не строгое научное определение), можно предложить. Жизнь – сложная, органическая, функциональная, открытая система, построенная из биологических функциональных единиц, направленная на противодействие энтропии, состоящая из относительно дискретных элементов, в основе которой лежат принципы обмена вещества и энергии с окружающей средой, самоподдержания, самозащиты, самовоспроизведения, передачи по наследству информации о себе и о своем развитии и т.п.

Таким образом, если мы собираемся произвести разделение некоего сложного биологического феномена на уровни организации, необходимо четко определиться с тем, 1) какой конкретно биологический феномен мы собираемся разбить, 2) по какому принципу мы собираемся произвести разделение.

Но необходимо четко понимать, что каждое из этих явлений – отличный от других биологический феномен, который должен быть определен, подход к изучению которого также должен быть специфичным, а, следовательно, и результат – то есть сами схемы уровней – могут оказаться различными.

Но главный, смысловой тезис утверждения С.С. Шварца мы принимаем однозначно: при рассмотрении проблемы деления явления жизни на уровни организации существуют две основные системы интеграции: видовая, для которой, на наш взгляд, можно предложить более удачное название – “таксономическая”, и биогеоценотическая с более удачным, по нашему мнению, вариантом названия “функциональная”.

Есть еще и смысловой, семантический аспект проблемы, который следует обсудить, прежде чем использовать термины и понятия для какого-либо анализа уровней организации жизни. Так получилось, что в биологии в некоторых случаях одни и те же термины применяются для обозначения разных биологических феноменов. В данном случае такими терминами являются “вид” и “популяция”.

Термин “вид” может рассматриваться в двух значениях.

Во-первых, вид – совокупность особей, обладающих специфическим комплексом общих морфологических, физиологических и пр. характеристик. Этот комплекс формируется у представителей определенной группы в процессе эволюции. В данном случае он является выражением, проявлением ее видовой специфичности, поддерживаемой генетическими механизмами и естественным отбором, и может считаться элементом таксономической системы деления (таксономической классификации уровней организации жизни). Во-вторых, вид – функциональная единица, функциональная составляющая в структуре биоценоза. В этом значении понятия вид обычно описывается комплексом популяций. С одной стороны, каждая популяция представляет собой самостоятельную функциональную единицу. С другой стороны, она – часть комплекса популяций, объединенных общими характеристиками входящих в него особей. И речь, в данном случае, идет не о морфологических и физиологических характеристиках, которые отличают особей данного вида от особей другого, а о тех, которые отражают видоспецифичные функциональные

Таблица 1. Уровни организации жизни

Уровни организации		Варианты деления			
ЖИЗНЬ		формально структурное деление	функциональное деление		таксономическое деление
	Надорганизменный уровень	ТИП КЛАСС ОТРЯД СЕМЕЙСТВО РОД ВИД ПОПУЛЯЦИЯ	Уровень сообществ	БИОСФЕРА БИОЦЕНОЗ ВИД ПОПУЛЯЦИЯ	ТИП КЛАСС ОТРЯД СЕМЕЙСТВО РОД ВИД ³ ПОПУЛЯЦИЯ'
	Уровень организма (одноклеточного или многоклеточного)	ОРГАНИЗМ (у одноклеточного организма – органеллы и пр., у многоклеточного – ткани, органы, системы органов)	Уровень организмов	ОРГАНИЗМ многоклеточный (ткани, органы, системы органов)	–
	Уровень клетки	КЛЕТКА (как составная часть ткани, органа, системы органов – органеллы)		ОРГАНИЗМ одноклеточный (органеллы)	
	Биохимический уровень	–	Уровень эргомов	ЭРГОМЫ	–

свойства, формирующие и определяющие функцию популяций данного вида в функциональной структуре биоценоза. Таким образом, вид, в данном случае, может рассматриваться как элемент функциональной системы деления (функциональной классификации уровней организации жизни).

Итак, один и тот же термин “вид” означает два совершенно разных по смыслу понятия и при упоминании его в табл. 1 необходимо четко понимать, о чем идет речь. Такая же ситуация и с термином “популяция”. Популяция с позиции таксономической рассматривается как группа особей со значительной генетической однородностью внутри себя и существенной степенью панмиксии, но и с определенной генетической дискретностью по отношению к соседним популяциям, а чаще всего со схожестью ряда морфофизиологических признаков, общим ареалом и т.п.

В популяции, рассматриваемой с позиции функциональной, на первый план выступают другие характеристики. Биоценозы и биосфера в

целом являются живыми системами и, значит, организованы по принципам функционирования живой системы. Как это уже достаточно обоснованно доказано, вся структура биоценозов базируется на энергетических закономерностях, на потоках энергии (Николаев, 1971; Паавер, 1980; Раманд, 1981; Одум, 1986, и др.). Таким образом, экологическая структура жизни строго функциональна. Структурными единицами биоценозов являются составляющие их популяции, которые вступают между собой в функциональные отношения. В таком контексте популяция понимается как группа особей одного вида, выполняющая в рамках ценозов определенные единые функции. Теперь можно представить схему уровней организации жизни (табл. 1).

Примат функционализма в процессе эволюции и блочная структура жизни

Все результаты наших конкретных научных исследований и наш анализ литературных источников (Черлин, 1988, 1990, 2012, 2014, 2015, 2016, и др.) явственно “резонируют” с эволюционными идеями, высказанными замечательным советским физиологом А.М. Уголевым (1985). И прежде всего это касается двух взаимосвязанных аспектов

³ Апострофы над терминами ВИД' и ПОПУЛЯЦИЯ' в данном случае говорят о том, что, как указывалось выше, эти термины в разделах “Функциональное деление” и “Таксономическое деление” имеют разный смысл.

процесса эволюции: 1) однозначного функционализма как важнейшего принципа эволюционного процесса и 2) блочной структуры организации явления жизни. По мнению А.М. Уголева, любую систему, структуру или их изменения возможно оценивать только исходя из их функциональной значимости, что согласуется и дополняется принципом оптимальности в биологии (Розен, 1969, и др.). При этом, существует вполне конечный и стандартный для всей биоты набор элементарных физиологических функций, а все сложные функции, развивающиеся в процессе эволюции, складываются из этих элементарных, как большое, сложное здание строится из набора ограниченного количества стандартных строительных элементов. Стандартные элементарные функции выполняются стандартными же “элементарными функциональными машинами”, которые представляют собой некие комплексы биохимических соединений (в частности — ферментов) и которые А.М. Уголев назвал “эргмами”. Из этого следует, что элементарными функциональными единицами феномена жизни являются эргомы, а оптимизация их деятельности — важнейший принцип, лежащий в основе всего процесса, одно из главных требований к изменениям организации (эволюции) биоты. Ярким примером такой оптимизации (и, следовательно, одной из сил, направляющих эволюционный процесс) является стабилизация высокой температуры тела в эволюции позвоночных животных (Рюмин, 1940; Черлин, 1990, 2012, 2017, 2021).

Скорее всего, если внимательно проанализировать то, что нам известно об эволюционном процессе с несколько нетрадиционной стороны, то можно будет увидеть и другие эволюционные принципы, направленные на оптимизацию деятельности разных элементов единой гигантской сложнейшей функциональной системы под названием “жизнь”.

Эволюция, связанная с некоторыми внутренними свойствами явления жизни

Напомним примеры того, как свойства и закономерности существования “строительного материала” феномена жизни (уровень эргмов) определяют, направляют и канализируют процесс морфофизиологической эволюции разных групп позвоночных животных. Мы уже упоминали о них в первой части статьи (Черлин, 2021), в одном из разделов которой мы описывали, как энергетическая оптимизация свойств ферментов (возможно, и других важных соединений на уровне эргмов) инициирует реализацию принципа стабилизации высокой температуры в эволюции позвоночных (Черлин, 1990, 2012, 2017; Черлин и др., 2016).

Мы уже отмечали (Черлин, 2017), как резкое усиление интенсивности сопряженного и несопряженного окисления в митохондриях способствует важнейшим эволюционным, ароморфным изменениям морфофизиологической структуры у позвоночных, освоению предками рептилий суши и воздушной среды, и создает предпосылки, с одной стороны, к рептилизации, к развитию по генеральному направлению эктотермии, с другой — к развитию по генеральному направлению эндотермии, к появлению птиц и к маммализации (Черлин, 2017, 2021). Другими словами, внутренние свойства элементов “строительного материала” определенным образом организуют то, что из него может быть построено.

Таким образом, механизмы эволюции, связанные с внутренними характеристиками явления жизни, направлены на энергетическую оптимизацию деятельности структур, прежде всего на уровнях организации, близких к элементарным функциональным единицам жизни — эргмам. Они являются ключевыми, направляющими, они канализируют морфофизиологическую эволюцию позвоночных животных на всех более высоких уровнях организации.

Эволюция, связанная с взаимодействием феномена жизни и окружающей среды

Существует, например, вид, составленный рядом популяций, обитающих в несколько различных условиях среды. В результате наличия изначальных генотипических различий в популяциях и разнонаправленного отбора в связи с разницей во внешних условиях, с течением времени в популяциях накапливаются генетические различия. Эти различия в определенных условиях начинают затрагивать все большее количество признаков, систем, и могут привести к серьезным биохимическим, генетическим, морфологическим, физиологическим и пр. перестройкам, а в конечном итоге — к репродуктивной изоляции и к выходу на новый видовой уровень. Если такой процесс действительно происходит в реальном мире (а это поддерживается сейчас большинством исследователей и положениями современной теории эволюции — Майр, 1974; Воронцов, 1980; Егоров, 1983; Северцов, 2005, и мн. др.), то связан он с постепенным накоплением адаптивных изменений в популяциях, а основная предпосылка — различия генетических фонов популяций. Таким образом, могут образовываться, вероятно, и категории типа “комплекса видов” и более высокие — роды. Так, на острове Минданао на Филиппинах примерно 10 тыс. лет назад после извержения вулкана Апо сформировалось озеро Ланао. В результате из одного исходного вида рыб — *Barbus binofutus* — образовалось 18 эндемичных видов, принадлежащих к 5 родам (Хлебосолов, 2004). Еще одной иллюстрацией может служить группа

сиговых рыб (*Coregonus*), на примере которой продемонстрировано, как молодой комплекс может разделиться на ряд новых видов (Кузнецов, 1973). Того же порядка, по всей вероятности, и явление, так хорошо известное палеонтологам, — это смена во времени одного вида другим без зафиксированной и проиллюстрированной дивергенции (Старобогатов, 1985). Имеются также описания знаменитых опытов Г.Х. Шапошникова (1961) с отбором тлей по типу питания, приведших к серьезной морфофизиологической дифференциации исходно единообразной популяции тлей, и даже в отдельных случаях — к репродуктивной изоляции сформировавшихся групп. Существуют и другие подобные примеры.

Однако необходимо четко понимать, что на самом деле показывают приведенные выше и другие подобные материалы. Современные молекулярные, генетические и пр. методы выявляют родство между популяциями и линиями последовательных видов, родов и т.п., то есть они показывают, что во времени одни виды могут и реально преобразуются в другие. Но нам не известны данные, которые могли бы пролить свет на механизмы этого превращения, на роль в нем адаптивно направленного отбора или других процессов.

Есть примеры видообразования у позвоночных с помощью специфических генетических механизмов. Это хорошо изучено, например, на лягушках комплекса *Pelophylax ridibundus*. Редкое исключение в этой связи среди пресмыкающихся составляют, в частности, комплексы партеногенетических ящериц, например рода *Darevskia* (Даревский, 1967; Ананьева и др., 2004), природа видообразования которых чисто генетическая.

Кроме того, существует определенная коллизия, выражающаяся в противоречии между адаптивно направленным естественным отбором и гомеостазом. Сложность и неоднозначность этих взаимоотношений продемонстрирована материалами наших исследований по термобиологии рептилий (Черлин, 2015). С одной стороны, в одних и тех же природных условиях можно встретить рептилий с сильно различающимися термобиологическими характеристиками, а в разных, порою сильно различающихся по климатическим условиям регионах можно встретить рептилий с очень сходными комплексами этих показателей. С другой стороны, у рептилий имеется очень хорошо развитый комплекс видоспецифичных и неизменных показателей термального гомеостаза, а их поведенческие терморегуляционные реакции оказываются направленными в основном на сохранение в неизменности этих комплексов термобиологических гомеостатических характеристик в различных условиях внешней среды (Черлин, 2015). Другими словами, в высшей степени эффективные поведенческие терморегуляционные и стабилизирующие реакции служат для того, чтобы внешние условия как можно меньше влияли на эндогенные термобиологические ха-

рактеристики, то есть чтобы изменения среды не меняли этих характеристик, а, следовательно, чтобы адаптивно направленный отбор не мог влиять на комплекс видоспецифичных гомеостатических показателей. Хотя существуют данные, иллюстрирующие некоторые возможные нестандартные (химические) варианты влияния внешних условий на элементы терморегуляционной системы организма (Skandalis et al., 2020).

Таким образом, мы видим две мощные противоборствующие силы: 1) комплекс термобиологических показателей, безусловно стремящийся к адаптации (модификации) характеристик организма к термальным условиям внешней среды, и 2) весьма развитый набор в основном поведенческих терморегуляционных реакций, стремящийся сохранить термофизиологические характеристики в полной неизменности. При этом существуют примеры того, что даже внутри одного рода (например, ящериц *Eremias*, *Podarcis* и др.) в условиях жаркого климата имеются виды, у которых температуры полной активности⁴ и температуры термостабилизации⁵ оказываются существенно выше, чем у ящериц из более прохладных зон. Это говорит о том, что, по крайней мере, частично адаптации к температурному фактору реально происходят. Но, изучив исключительную эффективность поведенческой терморегуляции у этих животных, мы остановились перед странной, внутренне противоречивой ситуацией: объяснить, как и с помощью какого механизма адаптивного отбора могут на самом деле происходить такие эволюционные изменения, пока не представляется возможным. Другими словами, более детальное изучение проблемы показало лишь еще большую глубину нашего незнания и непонимания ее внутренних механизмов. Но это не повод отказаться от публикации данной статьи. Это

⁴ Полная активность — животные находятся в физиологическом состоянии, в полной мере без существенных физиологических ограничений обеспечивающем эффективное протекание всех основных поведенческих актов (локомоции, терморегуляция, питание, сексуальность, территориальность, защита, коммуникация и т.п.). В этом состоянии движения рептилий активны, быстры (адекватно видовым особенностям) и точны (Черлин, 2014).

⁵ Температуры термостабилизации — довольно узкий диапазон высоких температур тела, который рептилии, находясь в состоянии полной активности, направленно и оперативно поддерживают у себя в течение более или менее продолжительного времени. В цифровом выражении он почти соответствует тому, что ранее называли в литературе оптимальными или предпочитаемыми температурами, но определенными методически корректным способом (Черлин, 2013). По сути этот диапазон чаще всего не является ни оптимальным для физиологических процессов в организме, ни предпочитаемым, поскольку в основном это — компромисс между желаемым и возможным уровнями температур. Просто рептилии по ряду причин (пока не до конца понимаемых) стабилизируют в нем температуру своего тела. Поэтому мы нашли разумным и адекватным изменить его название на “диапазон термостабилизации”, убрав из него оценку причин этой стабилизации (Черлин, 2014).

лишь повод лучше осознать свое непонимание, необходимость по-другому посмотреть на проблему, на ее осмысление, и продолжить исследования. Таким образом, коллизия между изменчивостью, устойчивостью и отбором в данном случае, как и во многих других, требует серьезного, дополнительного изучения.

Важнейшие процессы, составляющие эволюцию

А.А. Любищев считал, что закономерности формы являются не только результатом приспособления, но имеют и собственную логику (Любищев, 1968, 1971а,б, и др.).

Н.П. Наумов (1972) и В.В. Черных (1986) отметили два процесса в эволюции живой природы: экогенез и таксономическую эволюцию. “Процесс изменения животных и растений, происходящий под влиянием таксономической организации, следовало бы назвать таксономической составляющей эволюции, или короче, таксономической эволюцией... Таксономическая составляющая эволюции поддерживается и направляется в результате взаимодействия родственных группировок, принадлежащих тому или другому уровню организации. Аналогичным образом процесс изменения органических форм, совершающийся в рамках биосистем экологического ряда, можно назвать экогенезом. Экогенез происходит под влиянием взаимодействия популяций самых разнообразных организмов, составляющих биоценоз, поэтому основным уровнем, на котором осуществляется экогенез, является популяционно-биоценотический.

Эволюция, происходящая на популяционно-биоценотическом уровне, не способна вывести организмы на более высокий таксономический уровень, чем видовой. Таксономическая же эволюция организмов возможна только начиная с видового уровня. Таким образом, несмотря на то, что экогенез и таксономическая составляющая эволюции оказываются в некотором смысле сопряженными процессами, они в то же самое время протекают параллельно⁶. По существу, разрозненные популяции одного вида, включенные в разные биоценозы, не участвуют в таксономической эволюции, и только в случае восстановления

целостности вида начинает действовать собственно таксономический, в данном случае популяционно-видовой, уровень интеграции, который, как правило, и завершает процесс образования нового вида. Совершенно так же действуют и все последующие таксономические уровни интеграции, приводящие в движение сами виды, роды и таксоны более высокого ранга. Новый вид вновь в форме разрозненных популяций размещается в различных биоценозах. Там популяции вновь претерпевают те изменения, которые лягут в основу будущей таксономической эволюции” (Черных, 1986, с. 135–136).

Этот текст из книги В.В. Черных для наших рассуждений очень важен. Те процессы, которые увидели мы, по сути, несколько отличаются от того, что приведено в этой цитате. Но важно, что и этот автор, и мы отметили наличие двух процессов: один, связывающий и вписывающий популяции в общую функциональную структуру биоты, и второй, — формирующий многоуровневую таксономическую систему. История этого подхода знает много ученых, высказывавших сходные мысли ранее, но здесь мы не будем уходить вглубь лет — наша статья не об этом. Различия в наших подходах заключаются в том, что мы и В.В. Черных несколько по-разному видим механизмы наблюдаемых явлений. Это не означает, что прав либо только В.В. Черных, либо только мы. Скорее всего, реально существуют и те, и другие механизмы. Но мы подошли к данным обобщениям, исходя из своего опыта конкретной исследовательской работы по термобиологии рептилий.

Многие биологи, следуя за положениями синтетической теории эволюции, продолжают считать, что эволюция — процесс, базирующийся на постепенном накоплении в генотипе популяций под действием отбора мелких адаптивно ценных изменений фенотипа. Это приводит к постепенным преобразованиям генотипа особей в популяции, к переводу ее на новый, более высокий, видовой уровень и в дальнейшем — к формированию таксонов более высокого ранга. Это классический “дарвиновский” процесс, который развивается в направлении “от частного к общему”.

Для удобства изложения материала и его анализа этот процесс необходимо как-то назвать. По смыслу для него подходят два термина: “адаптогенез” или “экогенез”.

Адаптогенез — “формирование новых приспособительных функций, способствующих адаптации живых существ к определенным условиям внешней среды” (Термины..., 1996); “возникновение, развитие и преобразование приспособлений (адаптаций) в процессе эволюции организмов”

⁶ “Эту особенность биосистем надорганизменного уровня впервые отметил Н.П. Наумов (1972), указав на существование “параллельного и в известной мере независимого развития видов и объединяющих их таксонов родов, семейств и т.д., с одной стороны, и биогеоценологических систем — с другой” (с. 329). Однако в статье, из которой взята эта выдержка, тема “двух эволюций” осталась совершенно неразработанной и, думается, по этой причине не вызвала никакого резонанса в биологической и палеонтологической литературе”. Сноска также взята из работы Черных, 1986, с. 136.

(Дудка и др., 1984). Есть и другие определения, но они, практически, идентичны.

Возможно было бы применить и термин “экогенез”. Он был введен в 1904 г. немецким ученым Карлом Детто, который понимал под экогенезом процесс адаптации (приспособления) вообще (Detto, 1904). Вот еще несколько более поздних определений.

Экогенез — “развитие в процессе эволюции экологических отношений между организмами и средой... Иногда экогенез определяют как процесс возникновения новых форм под влиянием среды. Экогенезом, или экогенетическими сменами, называются также смены растительности, основной причиной которых является изменение экологических условий либо самими растениями (эндогенетические смены), либо внешними факторами (гологенетические смены)” (Большая..., 1969–1978); “1) эволюция (развитие) экосистем в различные геологические периоды, способствующая формированию межвидовых отношений и единства жизни; 2) исторический процесс внутренней дифференциации биосферы, становление межвидовых связей и единства жизни и окружающей ее среды (Давиташвили, 1948); 3) процесс становления экологии, условий” (Дедю, 1989); “процесс изменения органических форм, совершающийся в рамках биосистем экологического ряда” (Черных, 1986, с. 136).

Таким образом, по нашему мнению, в явлении эволюции жизни реально присутствуют как минимум два основных процесса. К одному, который по смыслу и по правилам ближе всего стоит к классическому “дарвиновскому”, более всего подходит термин “экогенез”, понимаемый как процесс возникновения новых форм под влиянием среды.

Однако очевидно, что процесс экогенеза сам по себе не описывает и не может описать всего многообразия комплекса явлений, наблюдаемых в эволюции. Так, в результате функционирования живой системы на базе биохимических и прочих эндогенных ее свойств со временем проявляются некоторые новые закономерности, функциональные связи и потребности, небольшая часть из которых была описана выше. В результате возникает некая новая система, более устойчивая в плане эндогенных свойств, но недостаточно адаптированная к условиям внешней среды, поскольку возникла она вне связи с процессом адаптации к условиям внешней среды (то есть вне экогенеза). В этом случае далее должен происходить процесс функциональной перестройки получившейся новой системы в направлении оптимизации связей со средой (адапта-

ции), что делает систему еще более энергетически эффективной и устойчивой. В качестве одного из возможных примеров уместно вспомнить хотя бы факт возникновения и развития химической терморегуляции у млекопитающих. Суть этого явления состоит в повышении теплопродукции в ответ на снижение температуры среды химическим путем без совершения механической работы. Это явление возникло, и, вероятно, в настоящее время наиболее полно проявляется у примитивных насекомоядных млекопитающих (Слоним, 1952). У более продвинутых групп этот энергетически невыгодный механизм терморегуляции ослабевает, уступая место менее энергоемкому холодовому тремору мышц и другим процессам, связанным с их сократительной деятельностью, в первую очередь дрожательному термогенезу (Иванов, 1965, 1972). Широкое распространение процессов оптимизации в природе само по себе говорит о том, что развитие “от частного к общему” (экогенез), которое лежит в основе микроэволюции — далеко не единственный вариант развития. Обратное направленный процесс — “от общего к частному” (оптимизация) может быть основным при развитии таксонов надвидового ранга, то есть в макроэволюции.

И этот процесс тоже необходимо как-то назвать. В некотором роде по смыслу ему подходит название “эндогенный таксоногенез”. Это название слишком длинное и неудобное в употреблении. Термин же “таксоногенез” по сути отражает лишь одну сторону процесса. И, кроме того, он уже преокупирован, хотя нам не удалось найти ему в литературе строгого определения. Его применяют специалисты во многих научных публикациях в смысле процесса, приводящего к формированию новых таксонов. Например: “И.С. Виноградов применил понятие “таксоногенез” для описания этапа таксономической дифференциации в гипотезе двухэтапности филогенеза покрытосеменных (Виноградов, Виноградова-Жукова, 1978⁷). Таксоны — систематические единицы разных рангов. Таксоногенез — естественный процесс, его течение отражается в таксонообразовании на микро-, макро- и мегаэволюционном уровнях. В природной среде каждый таксон существует в форме систем соподчиненных единиц (система популяций своего вида, система видов своего рода, система родов своего семейства и т.д.). Как биологические системы, таксоны в процессе эволюции проходят этапы зарождения, становления и последующего бытия. Представление о таксоногенезе как об аспекте филогенеза позволяет характеризовать его как трехэтапный про-

⁷ В данном случае ссылка на литературный источник — наша.

цесс (Ефимова, 1996). Первый этап — протогенез⁸. Этот этап — подготовительный, второй этап — арогенез⁹ — ключевой, третий этап — аллогенез¹⁰ — этап существования таксона в освоенной нише своего ценоза” (Ефимова, 2008, с. 99).

Проанализировав возможные варианты, мы выбрали для названия арогенетического процесса морфофизиологической оптимизации (эволюции) внутренней организации позвоночных животных хоть и не очень удобный, но, с нашей точки зрения, наиболее адекватный и приемлемый — “эндогенный таксоногенез”.

В этом случае процесс эволюции может происходить в большей или меньшей степени ортодоксально, в направлении “от общего к частному”.

Общие рассуждения об эволюции позвоночных

Итак, процесс эволюции, по крайней мере позвоночных, состоит из двух самостоятельных пластов — эндогенный таксоногенез и экогенез. Направленность течения эндогенного таксоногенеза — от общего к частному, экогенеза — от частного к общему. Наличие единства двух противоположно направленных сил — важнейшее и непреложное условие течения любого процесса. И экогенез, и эндогенный таксоногенез, протекая одновременно, являются двумя неразрывными сторонами процесса биологической прогрессивной эволюции, который ведет организмы к дифференциации и усложнению морфофизиологических систем (Северцов, 1939; Veer, 1958, и др.), к их совершенствованию (Северцов, 1939) и увеличению адаптированности к внешней среде.

Другими словами, по крайней мере часть признаков и свойств новых таксонов высокого ранга появляются вследствие процессов, связанных с проявлениями свойств и закономерностей динамического существования (развития) “строительного материала” жизни. Эти процессы могут иметь вполне определенную логику развития (биохимическую и др.), направляющую эволюци-

онное развитие морфофизиологической системы живых организмов. Эти процессы приводят к формированию групп животных, обладающих признаками высоких таксонов и идут “от общего к частному”. А уже после этого начинается процесс, который призван адаптировать получившиеся варианты более или менее общих морфофизиологических структур с признаками новых высоких таксонов к условиям внешней среды. Он идет “от частного к общему” и приводит к формированию видов и родов.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ НА УРОВНЕ ЭРГОМОВ

В этом разделе мы рассмотрим закономерности, связанные с динамикой внутренней организации на уровнях, близких элементарным функциональным единицам жизни — эргомам.

Объект эволюции — элементарные физиологические функции на уровне, близком к эргомам.

Основная линия развития на этом уровне — энергетическая оптимизация деятельности эргомов; создание “направляющего напряжения”, “направляющей силы” для процесса морфофизиологической эволюции на уровне организма, способствующей реализации принципа энергетической оптимизации в эволюции. Эта тенденция — один из важнейших ориентиров в эволюции, по крайней мере позвоночных.

Движущая сила эволюционного процесса на этом уровне — принцип энергетической оптимизации деятельности внутренних структур организма на уровне организации, близком к эргомам. Для позвоночных “раскрытием” этого принципа, одной из важнейших его функций является принцип стабилизации высокой температуры тела в эволюции этих животных.

В основе движущей силы данного уровня лежит ключевое противоречие между, с одной стороны, условиями, в которых “элементарные биохимические машины” могут быть максимально продуктивными, эффективными и энергетически экономичными, а с другой — условиями (характеристиками внутренней среды организма), в которых данные “биохимические машины” вынуждены реально работать в естественных условиях. Путей разрешения этого противоречия два: 1) изменение свойств сложных “биохимических машин”, составленных из элементарных свойств, то есть изменение набора эргомов, их взаимного расположения и т.п. (Уголев, 1983, 1985); 2) изменение внешних условий (в организации возможности выбора внешних условий), чтобы с их помощью соответствующим образом влиять на показатели внутренней среды для энергетической оптимизации работы эргомов, то есть поведенческая регуляция, модификация пространственно-временной структуры активности.

⁸ Протогенез — размножение растений почкованием.

⁹ Арогенез — “направление эволюции, приводящее к возникновению ароморфозов. В ходе арогенеза эволюционное развитие группы организмов приводит к возникновению таких приспособительных свойств, которые позволяют значительно расширить существующую зону или выйти в другую адаптивную зону” (Картель и др., 2011, с. 93).

¹⁰ Аллогенез — “направление эволюции группы организмов, при которой у близких видов происходит смена одних частных приспособлений другими, а общий уровень организации остается прежним. Аллогенез выражается в адаптивных преобразованиях (при смене сред обитания, например, наземной на водную) — алломорфозах, или идиоадаптациях. При аллогенезе одни органы прогрессивно развиваются и дифференцируются, другие — теряют функциональное значение и редуцируются; при этом происходит гармоничное преобразование всех стадий онтогенеза” (Биологический..., 1986, с. 18).

Эволюционными механизмами продвижения этих принципов являются, по-видимому, классические дарвиновские наследственность, изменчивость, естественный отбор и все, что с этим связано. При этом, важной особенностью механизма эволюции на уровне эргомов является то, что реализация их происходит с привлечением структур и механизмов более высокого уровня функциональной организации (организмов). Организмы нужны для осуществления энергетической оптимизации работы эргомов, поскольку именно изменения в морфофизиологических и поведенческих системах организма позволяют совместными действиями реализовать отмеченное выше эволюционное направление.

Основные селективные факторы для отбора на этом уровне организации связаны с комплексом условий, улучшающих энергетическую оптимизацию работы эргомов и других “биохимических машин”, исполняющих элементарные, единичные функции. Это могут быть, с одной стороны, биохимические адаптации, с другой — создание условий, при которых эти “биохимические машины” попадают в более энергетически оптимальные условия функционирования. Так, это может быть развитие физиологических реакций, увеличивающих эндогенным путем температуру тела (недрожательный или дрожательный эндогенный термогенез и т.п.), и/или развитие комплекса поведенческих реакций, способствующих тому, чтобы организмы попадали во внешние условия, повышающие температуру тела и позволяющие ее на этих высоких уровнях удерживать.

Эволюционным последствием описанных выше процессов на уровне эргомов является перестройка морфофизиологической структуры организмов, которые приобретают новый более или менее общий план морфофизиологической организации, общие физиологические и поведенческие реакции. Кроме того, на базе энергетической оптимизации работы эргомов происходит усложнение функций за счет появления дополнительных вставочных функциональных звеньев, а как следствие этого — морфофизиологическое усложнение систем в эволюции позвоночных животных (Черлин, 2012). Другими словами, появляются группы организмов с характерными общими признаками высоких таксонов. Таким образом, по нашему мнению, на уровне эргомов ведущим является эволюционный процесс, идущий по принципу эндогенного таксоногенеза.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ НА УРОВНЕ ОРГАНИЗМА

Именно на уровне организма мы можем констатировать, регистрировать и наблюдать результаты процесса, который мы называем морфофизиологической эволюцией. Это изменения во

времени морфологического строения и функционирования организма животных.

Закономерности, связанные с динамикой внутренней организации и функционирования на уровне организма

Объекты эволюции — сложные физиологические функции на уровне организма, организм как целая функциональная система.

Направленности эволюции на этом уровне: а) обеспечение реализации энергооптимизирующих процессов уровня эргомов за счет фундаментальных перестроек в морфофизиологических системах — ароморфозов разных уровней (продолжение, развитие процессов эндогенного таксоногенеза); б) оптимизация деятельности и развитие сложных функций.

Движущая сила эволюционного процесса на этом уровне — принцип энергетической оптимизации деятельности внутренних структур на обоих уровнях — эргомов и целого организма.

Важнейшее противоречие, лежащее в основе движущих сил на уровне организма, — противоречие, с одной стороны, между теми условиями, в которых элементарные и сложные функции организма могут быть максимально эффективными и энергетически экономичными, а с другой — условиями, в которых они реально работают. Путь разрешения этого противоречия такой же, что и в случае с уровнем эргомов, только энергетическая эффективность и экономичность перестроек морфофизиологических и поведенческих систем оцениваются отбором на уровне целого организма.

Эволюционные механизмы такие же, как и в случае с уровнем эргомов.

Основные селективные факторы на этом уровне организации связаны, с одной стороны, с комплексом условий, улучшающих энергетическую оптимизацию работы организма (хотя, по большому счету, разделить функциональные процессы в этой части на уровнях эргомов и организмов порой бывает очень сложно, поскольку они неразрывно связаны), с другой стороны — с усилением их адаптированности и конкурентоспособности (например, с улучшением качества выполнения ключевых функций на уровне организма — подвижности, активности, добывания пищи и ее переваривания, усложнением поведения, социальной структуры сообществ, успеха воспроизводства и т.п.).

Последствием эволюционного процесса, связанного с динамикой внутреннего функционирования и организации на уровне организма, является появление групп организмов, в большей или меньшей степени обладающих новыми, общими для групп качествами и характеристиками морфофизиологической организации. Это про-

должение и развитие процессов эндогенного таксоногенеза.

Закономерности, связанные с динамикой взаимоотношений организмов с внешней средой

Объекты эволюции — сложные физиологические функции на уровне организма; организм как целая функциональная система, взаимодействующая с внешней средой.

Направленность эволюционного процесса на уровне организма — достижение животными максимально возможного состояния адаптированности; адаптации групп живых организмов с новыми наборами морфофизиологических свойств, сформировавшихся в результате эндогенного таксоногенеза, к условиям внешней среды.

Для того, чтобы более четко понимать, о чем здесь идет речь, имеет смысл получить в свое распоряжение емкие определения в комплексе понятий, связанных с кажущимся очевидным процессом адаптации. В литературе мы нашли некоторое количество таких определений. Но, хотя об адаптации писали и пишут очень многие видные биологи, мы не обнаружили у них строгого, четкого, “концентрированного” и общепринятого определения основному термину — “адаптация”. Определения встретились по большей части в “околобиологической” литературе. Некоторые из них, тем не менее, вполне научные, хотя, на наш взгляд, требуют конкретизации и некоторой корректировки.

Адаптация — процесс приспособления организма, популяции или сообщества к определенным условиям внешней среды, соответствие между условиями внешней среды и способностью организмов процветать в ней (Дедю, 1989) — это наиболее общее определение¹¹;

— состояние динамического соответствия, равновесия между живой системой и внешней средой. Способность живого организма приспосабливаться к изменениям окружающей среды, внешних (внутренних) условий существования путем сохранения и поддержания физического гомеостаза (Краткий ..., 2008) — это определение более всего подходит для индивидуальных адаптаций¹².

Биологическая адаптация — процесс приспособления организма к меняющимся условиям внешней среды в процессе эволюции, включающий комплекс морфофизиологических и поведенческих особенностей особи, популяции или вида, обеспечивающий успех в конкуренции с другими видами, популяциями и особями и устойчивость к воздействиям факторов абиотиче-

ской среды (Энциклопедический..., 2013). Это определение более всего подходит для групповых (популяционных, видовых) адаптаций¹³.

Адаптацию в статическом понимании как достигнутый результат совершившегося развития можно определить как ансамбль свойств целого (обычно организма или иной биологической системы, но иногда употребляется и применительно к сложным, саморегулирующимся и самоорганизующимся устройствам), обеспечивающих его устойчивое существование и воспроизведение, то есть более или менее длительное сохранение ансамбля существенных параметров этого целого. В динамическом смысле адаптацию можно определить как процесс происхождения (приобретения) адаптации в первом значении (Палеонтология ..., 1995).

Существуют и другие определения, но мы взяли лишь самые общие и, главное, — характерные.

Исходя из опыта собственной работы по биологии рептилий и осмысления опубликованных материалов, представляется целесообразным дать собственное определение комплексу понятий, связанных с адаптациями в сложившемся у нас понимании.

В самом общем смысле определение адаптации может выглядеть так.

Адаптация — процесс приспособления организма, популяции или сообщества к определенным условиям внешней среды. Здесь — ничего нового.

Что характерно для подавляющего числа общих определений — смысл термина “адаптация” передается через слово “приспособление”, что не делает сам термин более понятным и строго научным, объясняющим суть явления. В этом случае необходимо определить, что значит тогда слово “приспособление”.

Приспособление организма, популяции или сообщества к определенным условиям внешней среды — процесс оптимизации необходимых и достаточных, энергетических и материальных (вещественных) затрат, обеспечивающих благополучную и конкурентоспособную жизнедеятельность особей, популяций, сообществ, процветание вида с наименьшими затратами внутренних ресурсов в данных условиях среды.

Но, кроме того, значительная часть адаптаций, касающихся в первую очередь особи, направлена на сохранение ею гомеостаза. Для таких случаев адаптацию можно определить таким образом.

Адаптация — биологическое явление (процесс), смысл которого заключается в сохранении комплекса видоспецифичных, “ключевых”, стабильных параметров гомеостаза живой системы в

¹¹Комментарий наш.

¹²Комментарий наш.

¹³Комментарий наш.

различных условиях среды с помощью видоспецифичного набора биохимических, физиологических и/или поведенческих приемов регуляции с целью обеспечения благополучной и конкурентоспособной жизнедеятельности особей, популяций, сообществ, процветания вида.

Индивидуальная адаптация — реакция индивидуального животного — направленная а) на реализацию актов жизнеобеспечения его как самостоятельной особи, на выполнение им всех необходимых физиологических и экологических функций в популяции и биоценозе в данных или меняющихся условиях среды с наименьшими возможными для данных условий (оптимальными) энергетическими затратами (Черлин, 2015), б) на безусловное сохранение в любых условиях внешней среды основных параметров гомеостаза (Черлин, 2015) и в) на получение животным конкурентных преимуществ перед другими особями.

Приемы адаптации — группоспецифичные и видоспецифичные приемы биохимической, физиологической и/или поведенческой регуляции (видоспецифичные регуляторные реакции), позволяющие сохранять в разных условиях среды неизменность, стабильность параметров гомеостаза живой системы.

Границы адаптивных возможностей: а) границы параметров внешней среды, в рамках которых видоспецифичные приемы адаптации способны сохранять неизменным видоспецифичный комплекс показателей гомеостаза; б) границы значений показателей гомеостаза, которые способны удерживать живые организмы с помощью видоспецифичного набора регуляторных реакций (приемов адаптации) в разных условиях среды.

Адаптированное состояние особи — это такое равновесное, устойчивое, более или менее оптимизированное, динамическое (способное возвращать устойчивость при изменении условий в определенных границах) состояние, при котором отдельное, индивидуальное животное может обеспечить выживание себя как самостоятельной особи с наименьшими возможными для данных условий (оптимальными) энергетическими затратами.

Здесь имеет смысл ввести понятие, которое, на наш взгляд, должно было бы стать важным при рассмотрении вопросов эволюции и адаптаций. Это понятие — “генеральная эндогенная логика эволюционного развития”.

Итак, генеральная эндогенная логика эволюционного развития (или короче — “генеральная логика развития”) — направленность эволюционного развития групп, которая определяется основными эндогенными канализирующими силами, действующими в рамках низших, относительно данной группы, уровней организации жизни или общесистемных требований. Генеральные

эндогенные логики эволюционного развития определяются, в основном, свойствами, закономерностями существования и развития эндогенных структур, составляющих нижний уровень организации жизни (эргомов и др.), и этим, в свою очередь, определяют “стратегические” направления развития групп более высокого порядка, являясь канализирующей силой этого развития.

Так, например, генеральной логикой развития линии эктотермных позвоночных (рыбы → амфибии → рептилии) является направленность на все большую стабилизацию высокой температуры тела (связанную, как мы помним, прежде всего с энергетической оптимизацией работы эргомов) и энергетическую оптимизацию деятельности всех морфологических структур, физиологических процессов и поведенческих систем. Эта генеральная логика ориентирована на наиболее энергетически экономное получение, ассимиляцию, использование и расходование внешнего тепла. Эта логика канализирует выход предков рептилий из воды на сушу и морфофизиологический процесс рептилизации (Черлин, 2017).

Генеральной логикой эволюционного развития линий эндотермных позвоночных (птиц и млекопитающих) является направленность на оптимизацию всех морфологических структур, физиологических процессов и поведенческих систем, ориентированная на наиболее энергетически экономное использование произведенного эндогенным путем тепла для улучшения энергообеспеченности и качества активности, скорости реакции, выносливости, а в целом — для усиления экологической конкурентоспособности. Эта логика канализирует, например, процесс маммализации.

Одни генеральные логики эндогенного развития на разных этапах могут существовать параллельно с другими, и иногда одни могут довлеть над другими. Так, в процессе рептилизации стремление к энергетической экономичности стало важнее, чем экологические преимущества. Дело здесь, вероятно, в том, что важнейшим ограничивающим фактором в новом качестве становился прежде всего уровень энергообеспеченности организма, а существующий уровень морфофизиологического устройства с большим трудом позволял бы обеспечить пищей и энергией более энергозатратную систему.

Кроме этого, энергетическая экономичность системы, которая по логике должна была бы иметь особую селективную ценность, в ряде случаев может “проигрывать” другим потребностям. Так, при развитии эндотермии, например, в процессе маммализации, у эндотермных животных необходимость реализации принципа стабилизации высокой температуры тела привела к ее постоянной (круглосуточной) стабилизации, что

значительно увеличило “непроизводительные” затраты энергии. Хотя, конечно, эти затраты не совсем “непроизводительные”, так как и в покое, и во сне у животных происходят важные физиологические процессы, требующие высоких температур. Так или иначе, но генеральная логика необходимости реализации принципа стабилизации высокой температуры в эволюции позвоночных в данном случае довлеет над энергетической экономичностью системы, поскольку новый, прошедший ароморфные изменения уровень морфофизиологической организации уже мог обеспечить высокую активность и в теплом, и в холодном климате, принципиально улучшить ее качество (интенсивность, выносливость, и т.п.) и экологическую конкурентоспособность. Другими словами, в данном случае генеральная логика энергетической экономичности “проиграла” в силе воздействия на эволюционный процесс экологической конкурентоспособности.

Генеральная эндогенная логика эволюционного развития проявляется, в основном, при рассмотрении эволюции ряда последовательных групп (родов, семейств, отрядов и выше). При этом, чем выше таксономический уровень групп, тем отчетливее эта логика может проявляться. И здесь важно понимать, что сама она чаще всего является не внешней адаптивно направленной силой, сформировавшейся под действием адаптации, а эндогенным, облигатным свойством “строительного материала” системы. Ведь даже улучшение качества активности — это, скорее, необходимость реализации внутреннего системного свойства.

Вот теперь можно более определенно говорить о закономерностях, связанных с динамикой взаимоотношений организмов с внешней средой.

Объекты эволюции — сложные физиологические функции на уровне организма; организм как целая функциональная система, взаимодействующая с внешней средой.

Направленность эволюционного процесса на уровне организма — адаптации живых организмов с наборами морфофизиологических свойств, полученных в результате эндогенного таксоногенеза, к условиям внешней среды.

Движущие силы эволюционного процесса на этом уровне: 1) принцип энергетической оптимизации деятельности внутренних структур на уровне организма, 2) оптимизация деятельности организма в различных условиях внешней среды.

Противоречия, лежащие в основе движущих сил на уровне организма лежат в двух плоскостях: 1) противоречие, с одной стороны, между теми условиями, в которых сложные функции организма могут быть максимально эффективными и энергетически экономичными, а с другой — условиями, в которых они реально работают; 2) про-

тиворечие между потенциальным состоянием морфофункциональной системы организма, максимально адекватным, экономичным и конкурентоспособным в данных условиях внешней среды, и тем состоянием, в котором оно находится в данный момент. Путь разрешения этого противоречия такой же, что и в случае с уровнем эргомов, только энергетическая эффективность и экономичность перестроек, морфофизиологических и поведенческих систем оценивается здесь именно на уровне целого организма.

Эволюционными механизмами, обеспечивающими усиление адаптированности, являются наследственность, изменчивость и отбор. Причем индивидуальный отбор отражается на генетической структуре популяции.

Основные селективные факторы на этом уровне организации для позвоночных — это улучшение качества активности, то есть интенсификация активности, получение возможности вести интенсивную активность продолжительное время, “включать” ее быстро и безынерционно.

Последствием эволюционного процесса на уровне организма является появление групп организмов, в большей или меньшей степени обладающих новыми качествами морфофизиологической организации, хорошо адаптированных к конкретным условиям внешней среды. Другими словами, появляются группы организмов с характерными признаками низких таксонов. Этот процесс мы уже упоминали в нашей статье, и мы называли его экогенезом. Таким образом, по нашему мнению, на уровне организма ведущим является эволюционный процесс, идущий по принципу экогенеза, хотя в нем безусловно имеются составные элементы и эндогенного таксоногенеза.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ НА УРОВНЕ СООБЩЕСТВ

Процессы, происходящие в сообществах и ценозах, также влияют на процесс эволюции. Популяции являются важнейшим звеном в эволюционных преобразованиях. Именно отбор на уровне популяций меняет генетическую норму представителей вида, является механизмом адаптивных перестроек их организма, а в дальнейшем, возможно, может стать причиной появления новых видов и, как считают многие ученые, может привести к формированию надвидовой таксономической структуры. Комплекс надвидовых таксонов, по мнению других ученых, формируется во взаимодействии разных популяций и таксонов как одного вида, так и всех видов, составляющих определенные сообщества, ценозы (Наумов, 1972; Черных, 1986, и др.).

Но от обсуждения закономерностей эволюционного процесса на уровне ценозов мы постара-

емся воздержаться, поскольку данная область не лежала в круге интересов наших исследований, и мы намного меньше о ней знаем.

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ О ПРОЦЕССЕ ЭВОЛЮЦИИ

“Механика” эволюционного процесса

Наследственность, изменчивость, отбор, изоляция, и другие функциональные элементы эволюции являются не факторами, не движущими силами эволюции, а лишь частями ее механизма. Этот классический дарвиновский механизм, образно говоря, как мотор автомобиля: он потенциально может обеспечить только движение как таковое. Однако для полноценного функционирования автомобиля одной возможности двигаться еще очень мало.

Чтобы мотор мог работать, ему необходимо топливо. Этим топливом, источником силы для мотора и движения автомобиля, то есть для процесса эволюции, является главное эволюционное противоречие. Мы считаем, что главным противоречием, заложенным в основу жизни и являющимся причиной ее дальнейшего эволюционного развития, выступает противоречие, между, с одной стороны, гомеостатическими характеристиками и потребностями внутренней системы организма, при которых эта система могла бы работать энергетически оптимально и экономично, а с другой стороны — неоптимальными условиями, в которых эта живая система фактически вынуждена работать в реальных условиях.

На важнейшем уровне элементарных структурных единиц жизни — эргомов — это противоречие заключается в том, что эргомы, по крайней мере в организмах позвоночных, реально вынуждены работать в условиях, отличающихся от тех, в которых их функционирование оказывается наиболее энергетически экономичным, эффективным, оптимальным и устойчивым.

Разрешение этого противоречия, а точнее, нескончаемый процесс его “сглаживания”, может идти по двум направлениям:

1) произвести внутренние изменения “живого”, функционирующего “строительного материала” жизни: формирование сложных функциональных комплексов (перегруппировка “ансамблей” эргомов, физиологических систем органов, усложнение поведенческих реакций в ответ на внешние воздействия и т.п.), которые на компромиссной основе за счет общего усложнения системы и ее реагирования на наличие и качество данного противоречия улучшают энергетические условия работы эргомов, максимально возможно приближают их к оптимальным, делают функционирование эргомов энергетически более эффективным (Рюмин, 1940; Черлин, 1990, 2012, и др.).

Так, за счет изменений внутренней структуры и функционирования живой системы реализуется в эволюции направленность на усложнение организации живых организмов. А развитие определенных способов энергетической оптимизации функций и систем, обусловленное базовой организацией и свойствами эволюционирующей системы, определяет направленность, канализированность эволюционного процесса. Именно такой путь эволюционных изменений продемонстрировал А.М. Уголев, изучая эволюцию пищеварительной системы (Уголев, 1983, 1985);

2) произвести изменения во внешней среде: за счет поведенческих, физиологических и других регуляторных реакций произвести изменение пространственно-временной структуры активности, которая в новом варианте “перемещает” животных в то место и в то время, где и когда они могут наиболее энергетически дешевыми способами удерживать характеристики внутренней среды организма, характеристики гомеостаза, в максимально возможных энергетически оптимальных границах; другими словами, это и есть тот процесс, который называется “адаптация” (см. выше).

Движущие силы эволюции как таковые в классическом варианте дарвинизма и в современной концепции эволюционной теории на самом деле оказываются скрытыми. Единственной (при таком способе рассмотрения) реальной движущей силой остается адаптация к среде как “вещь в себе”, как “стремление к совершенству” Жана-Батиста Ламарка — плохо определяемая, абсолютная, априорно принимаемая аксиома, безусловная потребность всего живого.

В действительности же, на наш взгляд, основные движущие силы эволюции кроются, прежде всего, в самой организации жизни, они — ее неотъемлемый атрибут, так же как эволюция — атрибут, свойство, форма существования жизни. Основные движущие силы эволюции проявляются в энергетической оптимизации работы живых систем на всех уровнях их организации, начиная с самого элементарного и важнейшего — с эргомов. На базе этого процесса происходит адаптация, “подгонка” структуры и функций живых существ к конкретным условиям среды, чтобы, с одной стороны, сэкономить энергетические расходы, с другой — обеспечить себе жизненное пространство, еду, безопасность, достаточное воспроизводство, усиление выживаемости и конкурентоспособности.

Итак, наша машина тронулась с места. Но куда? Механизм, запустивший движение машины, сам по себе не способен определять необходимый маршрут и осуществлять движение по нему, то есть приводить к определенному результату: в данном случае — к направленному усложнению морфофизиологической структуры организмов, к

канализированному ее развитию по ряду вполне определенных направлений, к огромному многообразию проявлений жизни, которое мы наблюдаем в природе, не может обеспечить и развития той разветвленной, многоуровневой надвидовой, структуры, состоящей из дискретных элементов, которая представлена в филогенетической схеме. Другими словами, для движения с какой-то целью и по какому-то определенному маршруту нужно к этому механизму что-то важное добавить.

Основное стратегическое направление движения автомобиля определяет мелкомасштабная карта (генеральная логика эволюционного развития, детерминируемая процессом эндогенного таксоногенеза). На этой карте проложен маршрут, который указан генеральной логикой эволюционного развития.

Но карта очень общая. А в реалии на местности множество мелких и не очень препятствий: дороги, тропинки и проезды, ямы, камни, обрывы и колдобины, холмы, склоны и болота, которые на карте не отмечены и которые машине нужно объезжать. Это движение, приспособленное и скорректированное на конкретной местности, должен контролировать шофер — аналог процесса адаптации и экогенеза, действующего в форме отбора как некоей творческой и координирующей силы.

В результате возможность для машины успешно двигаться в нужном направлении обеспечивает большой комплекс различных механизмов, структур, условий, закономерностей. Только весь комплекс целиком!

Методологические замечания при изучении процесса эволюции

Как ни странно для нас самих, предлагаемое нами понимание процесса эволюции оказалось несколько сходно по форме с взглядами Ж. Б. Ламарка (Ламарк, 1935; Lamarck, 1809), который понимал эволюцию как совокупность двух независимых процессов: 1) градации — развитие от простого к сложному под воздействием стремления к совершенству как внутреннему свойству живого; и 2) изменения под воздействием внешней среды, приводящего к созданию разнообразия на каждой ступени развития. “Стремление к совершенству” он понимал, как малообъяснимое неотъемлемое свойство живого, а “изменения под воздействием внешней среды” — адаптацию — как индивидуальные изменения под воздействием упражнения и неупражнения органов и передачу приобретенных таким образом признаков по наследству.

В структуре схемы эволюции, представленной Ламарком, важно обратить внимание на главные

ее составляющие: а) генеральная идея, определяющая направленность процесса, и б) механизм реализации этой идеи. У большинства материалистически настроенных ученых, которые преобладают в современном материалистическом мире, даже упоминание об идее при рассмотрении различных процессов в материальном мире вызывало и вызывает ответ в виде безразличия, отвращения, высокомерной насмешки. Но, думается, здесь не все так просто! Взаимоотношение идеи и механизма ее реализации, на наш взгляд, — вполне продуктивный вариант современного рассмотрения соотношения процессов в таком сложном природном явлении, как эволюционное развитие. И идея в данном случае выступает не как некий “потусторонний”, “мистический”, или теологический феномен, не заслуживающий поэтому серьезного внимания, а как вполне материалистическое понятие, как выражение материалистически обоснованной закономерности.

В нашем случае в качестве идеи выступает генеральная эндогенная логика эволюционного развития, которая описывается вполне научно обоснованной закономерностью — направленностью на энергетическую оптимизацию деятельности живой системы. А сам процесс морфофизиологической эволюции, материальных перестроек системы — это механизм реализации идеи, основанный, с одной стороны, на внутренних свойствах “строительного материала” живой системы, а, с другой — на взаимодействии получающихся новых живых систем с окружающей средой (адаптации). И эта реализация может идти по множеству путей, демонстрируя много возможных вариантов эволюционного развития, много эволюционных ветвей. Таким образом, идея, или генеральная логика эволюционного морфофизиологического развития какой-либо группы животных — сформулированное выражение вполне материальных форм влияния, базирующегося на закономерностях функционирования нижележащих уровней организации жизни и прежде всего самого нижнего — эргомов.

Именно в рамках такого рассмотрения проблемы, механизмы обоих описанных нами эволюционных процессов — экогенеза и эндогенного таксоногенеза — можно представить в свете нашего современного понимания эволюции.

Так, ламарковскую градацию можно понимать как развитие от простого к сложному под воздействием определенной генеральной эндогенной логики развития, замещающей плохо определяемое понятие “стремление к совершенству”. Эта генеральная эндогенная логика эволюционного развития — не аморфный, чисто теоретический, малопонятный феномен, а вполне объяснимая, научно обоснованная закономерность — энергетическая.

ческая оптимизация деятельности системы на всех уровнях организации живого.

“Изменение под воздействием внешней среды” трансформируется в современном понимании в процесс адаптации, происходящий на организменном и популяционном уровнях под действием естественного отбора и закрепляемый в популяциях при помощи наследственности.

Тогда ламарковская модель, точнее, ее принципиальная, “философски” общая схема, приобретает вполне реалистическое и современное звучание, перестает конфликтовать с современным пониманием процесса. Старая ламарковская общая схема при этом наполняется современным содержанием.

Принципы и путь эволюции животных

Генеральная логика развития в рамках системы жизни — энергетическая оптимизация жизнедеятельности сложной функциональной системы жизни. Она реализуется в разных направлениях, разными способами. Один из главных кардинальных путей этой реализации — усложнение поведения, то есть формирование как можно более сложного, дифференцированного, тонкого и оперативного варианта реагирования на воздействия внешней среды. Это один из наиболее энергетически дешевых вариантов ответа, адаптации живой системы (организма) к внешним условиям. Решается эта задача, так или иначе, благодаря усложнению структуры и функций нервной системы.

Примерно около 3 млрд лет назад на Земле жили только беспозвоночные животные. Они были невероятно разнообразны по своему происхождению, строению и организации. Скорее всего, реализация генеральной логики развития у беспозвоночных шла весьма разнообразными, порой абсолютно непохожими друг на друга путями. Достаточно упомянуть лишь два кардинальных пути. Один из них — объединение большого количества отдельных общественных насекомых в единое сообщество, в некий “коллективный разум” общественных насекомых (например, муравейник). При этом каждая отдельная особь способна решать лишь весьма ограниченный круг довольно простых задач, а масса муравьев из муравейника (точнее, целый муравейник, выступающий в роли самостоятельной особи) может коллективными действиями решать весьма сложные задачи. Другой вариант — высокая концентрация отдельных ганглиев в единую окологлоточную дифференцированную массу (мозг), заключенную в хрящевую капсулу, и распределение ганглиев по нервной системе — у головоногих моллюсков. При этом, например, отдельная особь осьминога способна решать задачи, порой превосходящие по сложно-

сти такие задачи, которые в отдельных случаях не всегда могут решить даже такие высокоорганизованные млекопитающие, как крысы.

Это было отражением колоссального многообразия путей, по которым шла реализация, “материализация” общей генеральной логики развития. Другими словами, каждое большое направление развития, скорее всего, являлось “материализацией” какой-то своей более частной эндогенной логики развития.

В протерозое, около 2.7 млрд лет назад, на Земле появились первые хордовые животные.

К сожалению, никаких биохимических исследований на различных беспозвоночных и наиболее примитивных хордовых, которые дали бы возможность сравнить некоторые их характеристики, нам не известно. Судя по нашим представлениям, на уровне биохимии даже у первых хордовых можно было бы ожидать комплекс каких-то биохимических характеристик, которые при дальнейшем развитии могли бы, хотя бы теоретически, обеспечить им возможность для усиления активности, или развития других свойств и преимуществ, которые потенциально могли бы быть полезны как преадаптации на пути их усовершенствования в рамках определенного эволюционного пути, определяемого частной логикой эндогенного развития для хордовых. Другими словами, зная мы определенные биохимические характеристики примитивных хордовых, мы могли бы предположительно описать эндогенную логику эволюционного развития хордовых. И это было бы не чисто теоретическое предположение, а вариант описания последовательных трансформаций, базирующийся на уже известных аналогичных вариантах, описанных при развитии позвоночных животных.

Если бы это было так, то первые же морфологические и физиологические ароморфозы хордовых — начало развития внутреннего скелета, появление нервной трубки и органов дыхания внутри тела — четко уложились бы в генеральную логику развития, продиктованную указанной выше основной логикой развития хордовых. На настоящий момент, это — всего лишь теоретически обоснованная гипотеза.

В палеозое, примерно 500 млн лет назад, на Земле появились первые позвоночные животные.

Помимо реализации генеральной эндогенной логики развития — стабилизации высокой температуры тела, одно из направлений частной логики развития для позвоночных — усложнение, совершенствование поведенческих регуляторных и адаптивных реакций как наиболее эффективного, тонкого, разнообразного и энергетически дешевого пути адаптации к условиям внешней среды. Различные пути решения этой задачи в разных линиях позвоночных на морфофизиологическом уровне

идут в рамках общей логики — концентрация, увеличение массы, дифференциация и защита нервной системы.

Таким образом, способ реализации генеральной логики в конкретных материальных рамках — принцип стабилизации высокой температуры в эволюции позвоночных. Один из ключевых ароморфозов, мобилизующий комплекс событий, направленных на реализацию принципа стабилизации, — резкое повышение уровня сопряженного и несопряженного митохондриального окисления. Конкретная форма реализации принципа стабилизации — морфофизиологическая эволюция, производящая, с одной стороны, “координацию” внутренних систем жизнеобеспечения при новых “вводных” — в условиях повышенного митохондриального дыхания и повышенной температуры тела, с другой стороны — адаптацию, “тонкую подгонку” новой сформировавшейся системы организма (вида) к условиям внешней среды, для обеспечения энергетической эффективности и конкурентоспособности.

Морфофизиологическая эволюция в системе эволюционного процесса

То, что мы называем морфофизиологической эволюцией, на самом деле напоминает лишь крохотную головку на тонкой шее, принадлежащую какому-нибудь доисторическому, неизвестному и непонятному морскому гиганту. Эту головку мы могли бы увидеть над поверхностью воды, как мутную фотографию лохнесского чудовища, хотя огромное тело этого существа скрыто от нас толщей воды. В этом гигантском организме происходит бесчисленное множество различных процессов, которые нам неизвестны. Попытки свести всю сложнейшую жизнедеятельность этого гиганта к какому-то одному, более или менее единообразному процессу — безумие! При этом, применив здесь слово “безумие”, мы ни в коем случае не хотели никого обидеть. Это лишь образное выражение для “неоправданности”. Мы с глубочайшим уважением относимся ко всем, кто старается вникнуть в эту сложнейшую область знаний, но вызываем к научному благоразумию.

В этом огромном “организме” — в морфофизиологической эволюции — сосуществуют, параллельно функционируют много процессов, порой противоположно направленных. Это нормально. По большому счету как раз это и есть то, что позволяет существовать динамической системе, жить, обеспечивать ее устойчивость и реагирование, ее развитие. А если это так, то нет никакого смысла противопоставлять эти процессы друг другу в обсуждениях того, какой процесс в эволюции является истинным, а какой — ошибка, непонимание исследователей и т.п.

С этой точки зрения, на наш взгляд, в реальной жизни нет никакого противопоставления дарвинизма и разных вариантов развития: ортогенеза, арогенеза, номогенеза, генетических закономерностей, сальтационизма и других процессов, происходящих в биоте. Все они реально существуют и сосуществуют (Попов, 2005), взаимодействуют, помогают и противодействуют друг другу. И все вместе они составляют тот сложнейший, единый, комплексный “ансамбль”, который можно назвать словами, вызывающими “священный трепет” у специалистов — “жизнь” и “эволюция”. А этот трепет появляется потому, что он сродни ощущению, возникающему при соприкосновении нашего достаточно ограниченного ума с такими непостижимыми и даже пугающими своими неосмысляемыми масштабами понятиями, как “бесконечность”, “вечность”, “вселенная”, как философские категории “смерть” и “любовь” ...

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ход эволюционного процесса у позвоночных животных, на наш взгляд, может рассматриваться как двуединый процесс.

Значительная часть эволюционного развития позвоночных животных определяется в первую очередь специфическими внутренними свойствами и закономерностями “строительного материала” феномена жизни, действующими, прежде всего, на самом элементарном уровне его функциональной организации — на уровне эргомов. Именно на этом уровне проявляются ключевые ароморфозы, приводящие к бурному морфофизиологическому развитию по определенным направлениям у позвоночных животных, к канализированному, ортогенетическому развитию морфофизиологической организации.

Главной организующей и канализирующей силой эволюционного процесса в каждом направлении развития является своя специфическая генеральная эндогенная логика развития. Она появляется после какой-либо ароморфной перестройки на нижнем уровне организации, детерминируется свойствами этого нижнего уровня и развивается как материальное выражение направленности на энергетическую оптимизацию жизнедеятельности живой системы с новыми базовыми характеристиками. Таким образом, генеральная эндогенная логика эволюционного развития определяет “стратегические” направления развития групп.

Так, мутации, приводящие к резкому увеличению количества митохондрий и площади их внутренних мембран, числа эритроцитов, и т.п., приводят к мощным скачкам в интенсивности сопряженного и несопряженного окисления (Черлин,

2017). Далее, энергетическая оптимизация деятельности эргомов (и ее частный случай — необходимость повышения температуры тела) приводят к канализированному, ортогенетическому развитию морфофизиологической организации, направленной на реализацию этих закономерностей. Это развитие от общего к частному происходит более или менее направлено. Вследствие этого появляются группы, обладающие набором общих признаков, присущих прежде всего высоким таксонам — типам, классам, отрядам, возможно семействам.

Это процесс эндогенного таксоногенеза. Так, по-видимому, протекает макроэволюция.

Получившиеся в результате первого процесса группы животных обладают некоторым набором общих свойств, но в своем происхождении они не были связаны с адаптациями к условиям внешней среды. Таким образом, параллельно с первым процессом, идет и второй — адаптации таких новых групп к условиям среды. Происходит их дифференциация. Это развитие от частного к общему приводит к появлению видов, родов, и возможно — семейств.

Это процесс экогенеза. Очевидно, так протекает микроэволюция.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Халиков Р.Г. и др.* Атлас пресмыкающихся Северной Евразии (таксономическое разнообразие, географическое распространение и природоохранный статус). СПб.: ЗИН РАН, 2004. 232 с.
- Афанасьев Б.Г.* Мир живого: системность, эволюция и управление. М.: Изд. полит. лит-ры, 1986. 334 с.
- Биологический энциклопедический словарь. М.: Сов. энциклопедия, 1986. 831 с.
- Большая советская энциклопедия. М.: Сов. энциклопедия, 1969—1978.
- Виноградов И.С., Виноградова-Жукова Н.А.* Двухэтапность филогенеза покрытосеменных // Цветковые растения. Орджоникидзе: СОГУ, 1978. С. 3—30.
- Воронцов Н.Н.* Синтетическая теория эволюции: ее источники, основные постулаты и нерешенные проблемы // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1980. Т. 25. № 3. С. 293—312.
- Гаак В.* Происхождение животного мира. СПб: Просвещение, 1900. 634 с.
- Давиташвили Л.Ш.* История эволюционной палеонтологии от Дарвина до наших дней. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. 575 с.
- Даревский И.С.* Скальные ящерицы Кавказа. Л.: Наука, 1967. 214 с.
- Дедю И.И.* Экологический энциклопедический словарь. Кишинев: Гл. ред. Молд. сов. энциклопедии, 1989. 406 с.
- Дудка И.А., Вассер С.П., Голубинский И.Н.* Словарь ботанических терминов. Киев: Наукова думка, 1984. 307 с.
- Егоров Ю.Е.* Механизмы дивергенции. М.: Наука, 1983. 176 с.
- Ефимова В.А.* Трехэтапность филогенеза // IX Московское совещание по филогении растений. М., 1996. С. 50—52.
- Ефимова В.А.* Изменение представлений об осуществлении филогенеза // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века / Мат. Всерос. конф. (Петрозаводск, 22—27 сентября 2008 г.). С. 99—100. Часть 3: Молекулярная систематика и биосистематика. Флора и систематика высших растений и флористика. Палеоботаника. Культурные и сорные растения. Ботаническое ресурсосведение и фармакогнозия. Охрана растительного мира. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2008. 419 с.
- Завадский К.М.* Учение о виде. Л.: Изд. АН СССР, 1961. 415 с.
- Заварзин А.А.* Труды по теории параллелизма и эволюционная динамика тканей. Л.: Наука, 1986. 194 с.
- Иванов К.П.* Мышечная система и химическая терморегуляция. М.-Л.: Наука, 1965. 127 с.
- Иванов К.П.* Биоэнергетика и температурный гомеостазис. Л.: Наука, 1972. 172 с.
- Капра Ф.* Паутина жизни. Новое научное понимание живых систем. Киев; М.: София, 2003. 336 с.
- Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М.* Генетика. Энциклопедический словарь. Минск: Белорусская наука, 2011. 992 с.
- Краткий толковый психолого-психиатрический словарь / Ред. К. Игишев. М.: Гнозис, 2008. 416 с.
- Кузнецов В.В.* Изменчивость в группе молодых животных (на примере сегонов) // Некоторые проблемы истории эволюции. М.: Изд-во II Моск. мед. ин-та, 1973. С. 41—47.
- Ламарк Ж.-Б.* Философия биологии. М.-Л.: Гос. изд-во биол. и мед. лит-ры, 1935. Т. 1. 330 с.
- Любичев А.А.* Проблемы систематики // Проблемы эволюции. Т. 1. Новосибирск: Наука, 1968. С. 7—29.
- Любичев А.А.* О критериях реальности в таксономии // Информационные вопросы семиотики, лингвистики и автоматического перевода. М.: ВИНТИ, 1971а. Вып. 1. С. 67—81.
- Любичев А.А.* Рец. на ст. Кронквист А. Об отношении таксономии и эволюции / Современные проблемы генетики и цитологии. 1971б. Вып. 6. С. 57—68.
- Майр Э.* Популяции, виды и эволюция. М.: Мир, 1974. 460 с.

- Матурана У.Р., Варела Ф.Х. Древо познания. Биологические корни человеческого познания. М.: Прогресс-Традиция, 2001. 224 с.
- Мейен С.В. Проблема направленности эволюции // Проблемы теории эволюции. Итоги науки и техники. Серия: Зоология позвоночных. Т. 7. М.: ВИНТИ, 1975. С. 66–119.
- Наумов Н.П. Проблемы и задачи популяционной биологии // Развитие концепции структурных уровней в биологии. М.: Наука, 1972. С. 322–331.
- Николаев Л.А. Основы физической химии биологических процессов. М.: Высшая школа, 1971. 240 с.
- Одум Ю. Экология. Т. 1. М.: Мир, 1986. 328 с.
- Паавер К.Л. Проблемы целостного изучения процесса эволюции // Микро- и макроэволюция / Мат. симп. “Микро- и макроэволюция”, Кяэрику, 2–5 сентября 1980 г. Тарту, 1980. С. 32–36.
- Палеонтология и палеоэкология. Словарь. М.: Недра, 1995. 494 с.
- Попов И.Ю. Ортогенез против дарвинизма историко-научный анализ концепций направленной эволюции. СПб: Изд. СПбГУ, 2005. 204 с.
- Раманд Ф. Основы прикладной экологии: воздействие человека на биосферу / Ред. Л. Т. Матвеев. Л.: Гидрометеиздат. 1981. 543 с.
- Раутиан А.С. О природе генотипа и наследственности // Журн. общ. биол. 1993. Т. 54. № 2. С. 131–167.
- Раутиан А.С. Букет законов эволюции // Эволюция биосферы и биоразнообразия. К 70-летию А.Ю. Розанова. М.: КМК, 2006. С. 20–38.
- Розен Р. Принцип оптимальности в биологии. М.: Мир, 1969. 215 с.
- Рюмин А.В. Значение температуры в онтогенезе и филогенезе животных // Успехи соврем. биол. 1940. Т. 12. № 3. С. 504–515.
- Северцов А.Н. Морфологические закономерности эволюции. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1939. 610 с.
- Северцов А.С. Теория эволюции. М.: Гуманитар. изд. центр ВЛАДОС, 2005. 380 с.
- Слоним А.Д. Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. М.: Изд. АН СССР, 1952. 327 с.
- Старобогатов Я.И. Проблема видообразования // Итоги науки и техники. Серия: Общ. геол. Вып. 20. М.: ВИНТИ, 1985. 92 с.
- Термины и определения, используемые в селекции, генетике и воспроизводстве сельскохозяйственных животных. М.: ВНИИплем, 1996. 306 с.
- Уголев А.М. Функциональная эволюция и гипотеза функциональных блоков // Журн. эвол. биохим. физиол. 1983. Т. 19. №4. С. 390–399.
- Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука, 1985. 544 с.
- Ушаков Д.Н. Толковый словарь современного русского языка. М.: Аделант, 2013. 800 с.
- Хлебосолов Е.И. Лекции по теории эволюции. М.: УЦ “Перспектива”, 2004. 264 с.
- Черлин В.А. Интенсивность окисления митохондрий печени разных классов позвоночных животных при различных температурах // Тез. науч. сообще-ний IV съезда физиологов Узбекистана. Ташкент, 9–11 ноября 1988. Ташкент, 1988. С. 140–141.
- Черлин В.А. Стабилизация высокой температуры тела в эволюции позвоночных животных // Успехи соврем. биол. 1990. Т. 109. № 3. С. 440–452.
- Черлин В.А. Организация процесса жизни как системы. СПб.: Русско-Балтийский информационный центр “БЛИЦ”, 2012. 124 с.
- Черлин В.А. Рептилии: температура и экология. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2014. 442 с.
- Черлин В.А. Тепловые адаптации рептилий и механизмы их формирования // Принципы экологии. 2015. Т. 4. № 1. С. 17–76.
- Черлин В.А. Современный взгляд на термобиологию с позиции изучения рептилий // Биосфера. 2016. Т. 8. № 1. С. 47–67.
- Черлин В.А. Значение изменений интенсивности сопряженного и несопряженного дыхания митохондрий в эволюции позвоночных животных // Успехи соврем. биол. 2017. Т. 137. № 5. С. 479–497.
- Черлин В.А. Гипотеза о механизмах эволюционного процесса и его канализации на примере позвоночных животных. Часть 1. Эволюция, связанная с высокой температурой тела // Успехи соврем. биол. 2021. Т. 141. № 1. С. 78–104.
- Черлин В.А., Леонтьева О.А., Червяцова О.Я. Александр Владимирович Рюмин – забытый биолог // Принципы экологии. 2016. Т. 5. № 4. С. 39–76.
- Черных В.В. Проблема целостности высших таксонов. М.: Наука, 1986. 143 с.
- Шапошников Г.Х. Специфичность и возникновение адаптаций к новым хозяевам у тлей (Homoptera, Aphidoidea) в процессе естественного отбора (экспериментальное исследование) // Энтомол. обозрение. 1961. Т. 40. №4. С. 739–762.
- Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. М.: Наука, 1980. 278 с.
- Шишкин М.А. Эволюция как эпигенетический процесс // Современная палеонтология. Т. 2. М.: Недра, 1988. С. 142–169.
- Энциклопедический словарь по психологии и педагогике [Электронный ресурс]. 2013. (http://psychology_pedagogy.academic.ru/).
- de Beer G.R. Embryos and ancestors. Oxford: Clarendon press, 1958. 197 p.
- Detto C. Die Theorie der directen Anpassung und ihre Bedeutung für das Anpassungs und Deszendenzproblem. Jena: G. Fischer, 1904. 214 S.
- Eimer T.G.G. Die Entstehung der Arten auf Grund von verebten erworbenen Eigenschaften nach den Gesetzen Organischen Wachsen. Teil. 2. Leipzig: W. Engelmann, 1897. VI+XVI+513 S.
- Haake W. Gestalt und Vererbung. Eine Entwicklungsmechanik der Organismen. Leipzig: T.O. Weigel Nachfolger, 1893. 337 S.
- Lamarck J.B.P.A. Philosophie Zoologique. Paris: Dentu, 1809. 429 S.
- Lull R.S. Organic Evolution. N.Y.: MacMillan, 1936. 743 p.
- Skandalis D. A., Dobell C. D., Shaw J. C., Tattersall G. J. Hydrogen sulfide exposure reduces thermal set point in zebrafish // R. Soc. Open Sci. 2020. V. 7 (11).

P. 200416.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.06.935957>

Schweitzer M.H., Marshall C.L. A Molecular model for the evolution of endothermy in the theropod-bird lineage // J. Experim. Zool. (Mol. Dev. Evol.). 2001. V. 291. P. 317–338.

The Hypothesis on Mechanisms of the Evolutionary Process and Its Canalization on the Example of Vertebrate Animals. Part 2. Some Mechanisms of the Evolutionary Process in Vertebrates

V. A. Cherlin*

Dagestan State University, Makhachkala, Russia

**e-mail: cherlin51@mail.ru*

This is the second article of two on the evolutionary mechanisms in vertebrates. It illustrates important patterns that confirm that a significant part of the evolutionary development in vertebrates is determined primarily by the internal properties and patterns of the “building material” of the life phenomenon, operating at different levels of its functional organization, starting with the most elementary — from ergomes. Evolution in vertebrates is seen as a two-pronged process: 1) energy optimization, first of all, at the deepest level of organization of life — at the level of ergomes, leading to the canalized, orthogenetic development of morphology-physiological organization and the appearance of signs inherent primarily to high taxa (development from general to particular, macroevolution); 2) adaptation to the environmental conditions of the groups resulting from the first process, differentiating to species and genera (development from particular to general, microevolution).

Keywords: vertebrate animals, internal and external driving forces of the evolutionary process, canalization of evolution, evolutionary mechanisms