

# СОДЕРЖАНИЕ

---

Том 141, номер 4, 2021

---

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Функциональная роль окисления метионинов в белках: аргументы “за” и “против”<br><i>М. А. Розенфельд, Л. В. Юрина, А. Д. Васильева</i>    | 315 |
| Роль альбуминов сыворотки крови в проведении регуляторного сигнала у млекопитающих<br><i>М. С. Краснов, А. П. Ильина, В. П. Ямскова</i>  | 336 |
| Механизмы лекарственной устойчивости при остром миелоидном лейкозе<br><i>Н. М. Боброва, Т. В. Романовская</i>                            | 351 |
| К проблеме экспериментального моделирования сепсиса<br><i>М. Н. Черкасова</i>                                                            | 368 |
| Удаленные синцитии анастомозов смежных нейронов<br><i>О. С. Сотников, Л. А. Давыдова</i>                                                 | 382 |
| Цифровой механизм приема-передачи акустической информации у птиц<br><i>Б. М. Звонов</i>                                                  | 390 |
| К изучению линьки волосяного покрова мелких лесных млекопитающих (опыт аналитического обзора состояния проблемы)<br><i>Э. В. Ивантер</i> | 399 |

---

# Contents

---

**Vol. 141, No. 4, 2021**

---

|                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| The Functional Role of Methionin Oxidation in Proteins: Arguments “for” and “against”<br><i>M. A. Rosenfeld, L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva</i> | 315 |
| The Role of Serum Albumin in the Conduction of a Regulatory Signal in Mammals<br><i>M. S. Krasnov, A. P. Ilyina, V. P. Yamskova</i>            | 336 |
| Mechanisms of Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia Cells<br><i>N. M. Bobrova, T. V. Romanovskaya</i>                                      | 351 |
| On the Problem of Experimental Modeling of Sepsis<br><i>M. N. Cherkasova</i>                                                                   | 368 |
| Distant Syncytia of Adjacent Neuronal Anastomoses<br><i>O. S. Sotnikov, L. A. Davydova</i>                                                     | 382 |
| Digital Mechanism for Receiving and Transmitting Acoustic Information in Birds<br><i>B. M. Zvonov</i>                                          | 390 |
| Molting Study of the Hair Cover of Small Forest Mammals<br>(Experience of Analytical Review of the Problem)<br><i>E. V. Ivanter</i>            | 399 |

---

УДК 577.322.75

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ОКИСЛЕНИЯ МЕТИОНИНОВ В БЕЛКАХ: АРГУМЕНТЫ “ЗА” И “ПРОТИВ”

© 2021 г. М. А. Розенфельд<sup>1</sup>, \*, Л. В. Юрина<sup>1</sup>, А. Д. Васильева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

\*e-mail: rosenfeld41@mail.ru

Поступила в редакцию 21.12.2020 г.

После доработки 13.01.2021 г.

Принята к публикации 16.01.2021 г.

Превращение метионина в метионинсульфоксид (MetO) является одной из наиболее часто встречающихся окислительных модификаций в белках из-за особой восприимчивости метионина к окислительным условиям. Окисление метионина может влиять на структуру и функцию белка, а уровень MetO увеличивается при развитии окислительного стресса. Большинство клеток содержат метионинсульфоксид редуктазы (MSR), которые катализируют тиоредоксин-зависимое восстановление метионинсульфоксида в исходный метионин. Показано, что мутации, приводящие к снижению активности MSR, связаны со снижением устойчивости некоторых клеток к окислительному стрессу, тогда как мутации, приводящие к перепроизводству активности MSR, приводят к увеличению устойчивости к окислительному стрессу. В работе анализируются редокс-реакции метионинов в функциональной регуляции некоторых внутриклеточных белков, актина и кальмодулина, и обсуждается наличие антиоксидантных метионинов во внутриклеточных белках, таких как глутаминсинтетаза, 15-липоксигеназа, рекомбинантные белки, интерферон  $\alpha$ -2b, тканевой активатор плазминогена, фактор стволовых клеток человека. Отсутствие MSR в плазме крови делает окисление метионинов в белках необратимым, поэтому способность метионинов служить перехватчиками молекул окислителя без повреждения функции плазменных белков является достаточно дискуссионным. Антиоксидантные метионины были обнаружены в ряде белков, таких как макроглобулин, антитромбин III, фактор свертывания крови XIII. Однако для большинства белков плазмы крови антиоксидантные метионины не выявлены. Проводится корреляция между окислением метионинов и развитием патологических состояний в организме.

**Ключевые слова:** антиоксидантные и регуляторные метионины, метионинсульфоксид редуктазы, обратимое окисление, внутри- и внеклеточные белки

**DOI:** 10.31857/S0042132421040050

### ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы постоянно подвергаются воздействию высокореакционных и токсических продуктов, являющихся производными кислорода, получивших обобщенное название активных форм кислорода (АФК). В организме человека более 95% свободных радикалов относятся к свободным радикалам кислорода. Эти продукты могут продуцироваться экзогенно, как вредные вещества в атмосфере, и эндогенно, как побочные продукты ферментативных реакций клеточного метаболизма. К данным соединениям относят: озон ( $O_3$ ) перекись водорода ( $H_2O_2$ ), гидроксильный радикал ( $HO\cdot$ ), супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ). В присутствии гемсодержащих пероксидаз происходит образование гипохлоритных кислот ( $HOCl$ ,  $HOBr$ ,  $HOJ$ ), которые являются мощными токсинами,

обладающими чрезвычайно высокой химической реакционной способностью по отношению к органическим молекулам (Меньщикова и др., 2006; Панасенко, 2013; Карбышев, Абдуллаев, 2018; Cobley, 2020). Основным источником  $HOCl$  в организме является лейкоцитарная миелопероксидаза (Панасенко, 2013). В то время как небольшое количество АФК играет важную роль в процессах передачи сигналов в клетках (Ray et al., 2012), высокое содержание АФК определяет окислительный стресс, ответственный за серьезные метаболические нарушения и повреждение структур биологических макромолекул (Tse et al., 2016).

В настоящее время общепризнано, что белки выступают в качестве основной мишени для АФК (Davies, 2016). Вышеперечисленные производные кислорода способны повреждать белки, что в конечном итоге влияет на их структуру и проявляется в более или менее выраженной потере биохимической

мических функций. Окислители могут вызывать химические модификации боковых цепей аминокислотных остатков, превращение белка в производные, чувствительные к протеолитической деградации, образование белок-белковых поперечных связей и фрагментацию белка, как следствие разрыва полипептидной цепи белка (Stadtman, Levine, 2003; Hawkins et al., 2003). Существуют убедительные доказательства того, что белки, подвергающиеся окислительным посттрансляционным повреждениям с измененной пространственной структурой и функцией, накапливаются при старении, окислительном стрессе и в результате различных заболеваний (Grune et al., 2013).

Установлено, что эволюционно организмы выработали защитные механизмы против высокого уровня АФК (Lu et al., 2001). Защита от АФК-опосредованного окислительного повреждения белков, локализованных во внутриклеточном пространстве, катализируется большим разнообразием антиоксидантных систем. Наиболее эффективными ферментативными антиоксидантами являются супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, пероксиредоксины (Sagoch, Ferreira, 2013; Nimalaratne, Wu, 2015). Неферментативные антиоксиданты включают глутатион (GSH), тиоредоксин, аскорбат,  $\alpha$ -токоферол, мочевую кислоту и др. (Rizzo et al., 2010; Poljšak, Fink, 2014). Антиоксиданты могут действовать синергически по отношению к различным типам активных форм кислорода, предотвращая их образование либо превращая большинство реактивных метаболитов в менее активные, или способствуя инактивации этих токсических производных (Grune et al., 2013).

Будучи высокоуязвимым объектом для атаки АФК, белки и, следовательно, аминокислотные остатки, составляющие первичную структуру этих белков, подвергаются окислительному повреждению. Репарация повреждений в белках ограничивается восстановлением окисленных производных серосодержащих аминокислотных остатков, цистеина и метионина. Как полагают (Grune et al., 2013), причиной тому является множество возможных продуктов окисления 20 аминокислот, очевидно, превышающих по своему количеству диапазон эффективной репарации. Окислительное повреждение оставшегося большинства аминокислотных остатков (АКО) как во внеклеточных, так и во внутриклеточных белках, носит необратимый характер, то есть ни неферментативным, ни ферментативным способами эти остатки не могут быть восстановлены в исходную нативную форму. Не имеется ни одного свидетельства восстановления аминокислот, отличных от серосодержащих, в окисленных белках. Такие поврежденные белки являются мишенью для деградации различными внутриклеточными

протеазами, включая катепсины, кальпаины и особенно 20S-протеасому (Grune et al., 1996; Rivett, 1986).

Остатки цистеина (Cys) участвуют в каталитическом цикле многих ферментов и образуют дисульфидные связи, которые вносят вклад в структуру белка. Сера стабильно существует в нескольких степенях окисления, что делает ее универсальным компонентом в биологических системах. Остатки цистеина способны окисляться с образованием сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот, последняя из которых не может быть восстановлена в исходную форму. Самой высокоактивной и наиболее восстановленной формой серы в биомолекулах является тиол (-SH), присутствующий в аминокислоте Cys. Cys находится в активном центре многих белков и в различных белковых доменах, которые участвуют в регуляции ферментов, переносе белков, контроле экспрессии генов и передаче сигналов рецепторами (Grune, et al., 2013).

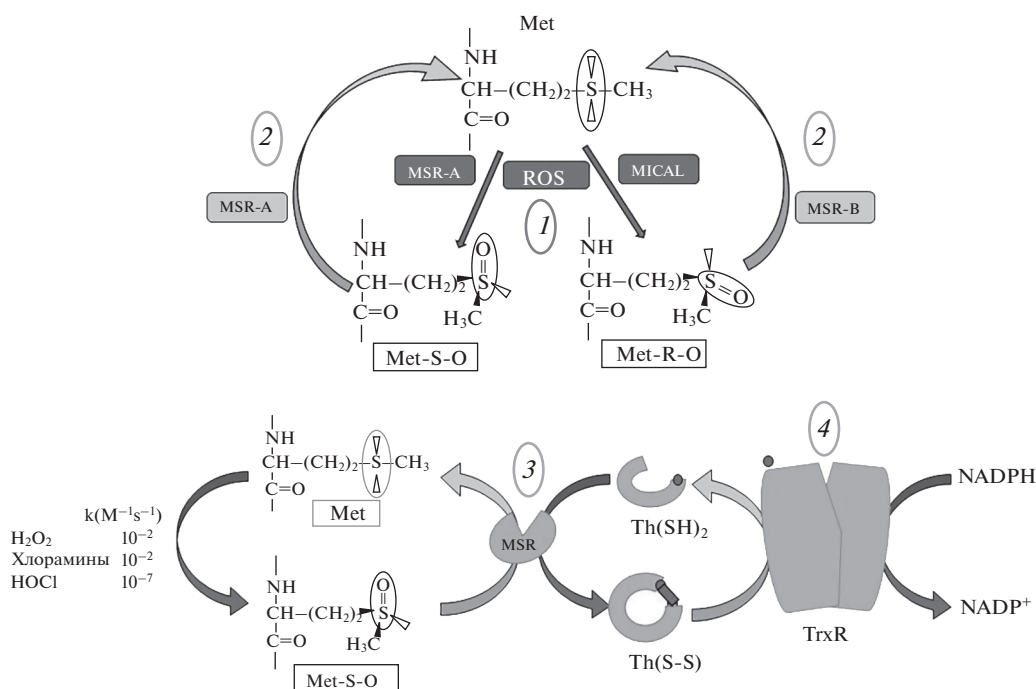
Остатки Cys белков особенно подвержены окислению АФК (Vogt, 1995). В отличие от других окислений, опосредованных АФК, окисление серосодержащих аминокислот, как упоминалось ранее, является обратимым. Окисление Cys-сульфгидрильных групп белков приводит к образованию либо внутримолекулярных (белок<sup>1</sup>S-белок<sup>1</sup>), либо межмолекулярных (белок<sup>1</sup>S-белок<sup>2</sup>) производных белков, поперечно связанных, а реакции с GSH дают смешанный дисульфид (белокS-SG). Эти дисульфидные производные могут быть восстановлены реакциями дисульфидного обмена, катализируемыми тиол-трансферазами, которые катализируют реакции между GSH и Trx [Th(SH)<sub>2</sub>] для регенерации сульфгидрильных групп белка. Как GS-SG, так и Th(S-S) могут быть восстановлены в нативную форму редуктазами (Nishinaka et al., 2001).

Функциональные последствия потери -SH включают неправильную укладку белка, каталитическую инактивацию, снижение антиоксидантной способности и потерю определенных специфических функций, таких как связывание тяжелых металлов и др.

## ОКИСЛЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИОНИНА В БЕЛКАХ

Долгое время полагали, что метионин в белках, помимо его участия в инициации трансляции, играет простую структурную роль, находясь в гидрофобном ядре, подобно другим гидрофобным аминокислотам, таким как лейцин, изолейцин и валин. Однако накопленные данные однозначно свидетельствуют, что метионин наделен разнообразными функциями. Метионин является важным клеточным антиоксидантом, стабилизи-





**Рис. 1.** Окисление и восстановление метионина. 1 — метиониновые остатки белков легко окисляются различными видами АФК до S- и R-стереоизомеров метионинсульфоксида (MetO); 2 — MetO может быть снова восстановлен до метионина с помощью метионинсульфоксид редуктаз (MSR-A и MSR-B), которые катализируют восстановление R- и S-изомеров; 3 — оба фермента используют тиоредоксин Trx (Th(SH)<sub>2</sub>) в качестве восстановителя; 4 — в присутствии NADPH окисленная форма Trx (Th(S-S)) может быть восстановлена с помощью фермента Trx редуктазы (TrxR). В конечном итоге, сопряженные реакции обеспечивают NADPH-зависимый механизм удаления АФК ( $\text{NADPH} + \text{H}^+ \text{АФК} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{продукты}$ ) (адаптировано по: Weissbach et al., 2005; Grune et al., 2013; Manta, Gladyshev, 2017; Aledo, 2019; Lim et al., 2019).

рует структуру белков, участвует в распознавании поверхностей белка и др. В недавно опубликованной прекрасной обзорной работе эти функции метионина в белках детально проанализированы (Aledo, 2019).

#### *Каталитическое восстановление окисленного метионина во внутриклеточных белках*

Из-за особой восприимчивости серосодержащей аминокислоты, метионина (Met), ко всем формам АФК, генерируемым в клетке, Met легко окисляется в условиях окислительного стресса (Weissbach et al., 2005), превращаясь в смесь S- и R-стереоизомеров (MetO). Образование метионинсульфоксида является одной из наиболее часто встречающихся окислительных модификаций белков. Однако, в отличие от окисления других аминокислотных остатков (кроме Cys), окисление Met до MetO обратимо. MetO может быть восстановлен в нативную форму Met под действием редуктаз (MSR-A и MSR-B), которые катализируют восстановление S- и R-изомеров MetO, соответственно, обратно до Met (Weissbach et al., 2005; Lim et al., 2019), (рис. 1).

#### *Влияние пространственного расположения и пептидного окружения на реакционную активность метионина*

Обратимое окисление метионинов позволяет рассматривать их как внутримолекулярные анти-оксиданты, которые защищают другие (не подлежащие восстановлению) аминокислоты от окисления (Lim et al., 2019). Другими словами, остатки метионина способны полностью или частично перехватывать окислители, прежде чем они смогут атаковать другие аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в поддержании структуры или функции белка. Наиболее легко окисляемые остатки метионина, экспонированные на поверхности белка (то есть максимально пространственно доступные для молекул окислителя), как правило, окисляются с незначительными последствиями для функциональности белка, в то время как оставшиеся остатки метионина, локализованные внутри белковой глобулы, которые являются жизненно важными для функционирования белка, гораздо менее подвержены окислению (Elmallah et al., 2013; Wang et al., 2016). Однако, так как в отличие от других гидрофобных остатков, таких как валин, лейцин или изолейцин, боковая цепь метионина является нераз-

ветвленной, обеспечивая ей достаточную гибкость, метионины, находящиеся внутри белка, но сохраняющие локальную структурную гибкость, также потенциально могут подвергаться окислению (Xu et al., 2012). Большое значение для функционирования белка имеет наличие антиоксидантных остатков метионина в предполагаемых антиоксидантных областях, являющихся ловушками различных видов окислителей (Rosenfeld et al., 2018).

Хотя доступность остатков метионина к растворителю является важным фактором, определяющим их склонность к окислению, она не может однозначно объяснять их реакционную способность только пространственной локализацией. Чтобы проанализировать другие возможные структурные факторы, были исследованы различные наборы метионинов, чувствительных к окислению или устойчивых к окислению, содержащихся в человеческих белках. Сравнение белков, содержащих окисленные метионины, со всеми белками в протеоме человека привело к заключению, что первые демонстрируют значительно более высокое среднее значение содержания метионина, чем последние. Внутри данного белка, изучение аминокислотной последовательности, окружающей неокисленный метионин, выявило предпочтительное расположение соседних остатков тирозина и триптофана, но не остатков фенилаланина. Результаты этих анализов позволили сделать вывод о том, что “S-ароматический мотив” снижает реакционную способность серосодержащего остатка метионина по отношению к окислителям (Aledo et al., 2015). С другой стороны, недавнее исследование предоставило биоинформатические данные, свидетельствующие о том, что окисление метионина усиливается в непосредственной близости от участков фосфорилирования (Veredas et al., 2017).

Окисление остатков метионина обычно увеличивает гидрофобность поверхности белков (Chao et al., 1997). С другой стороны, окисление метионина до сульфоксида должно было бы приводить к снижению гидрофобности поверхности белка (Gellman, 1991), потому что метионинсульфоксид, сам по себе, является более гидрофильным, чем исходный метионин. Однако внутри белка добавление кислорода к метионину, очевидно, нарушает естественную картину складывания полипептидной цепи, вызывая обнажение более гидрофобных, по сравнению с метионином, остатков (Moskovitz et al., 2000). Так как окисление поверхностно-локализованных метионинов вызывает увеличение гидрофобности белка, окисление одного такого метионина может изменять стабильность второго метионина, расположенного в другом месте белка, и вследствие этого способствовать его вовлечению в окислительный процесс (Walker et al., 2019). Другими словами,

можно говорить о наличии некоторого рода “кооперативности” в окислении остатков метионина, которая в свою очередь зависит от структурной стабильности белка в целом.

#### *Антиоксидантные метионины и клеточная регуляция*

Хотя АФК образуются в различных клеточных структурах, подавляющее большинство продукции АФК можно отнести к митохондриям (Гриценникова, Виноградов, 2013). Неудивительно, что эта органелла обладает множеством систем нейтрализации АФК. В этой связи, переназначение кодона AUA из изолейцина в метионин, наблюдаемое в генетическом коде митохондрий млекопитающих, было интерпретировано как адаптивный процесс, приводящий к накоплению антиоксидантных метионинов в реакциях дыхательной цепи (Bender et al., 2008). Действительно, в то время как среднее содержание метионина в белках, кодируемых ядерным геномом (nDNA), составляет около 2%, этот процент возрастает до 6%, когда анализируемые белки являются белками, кодируемыми митохондриальным геномом (mtDNA) (Aledo, 2019).

Таким образом, согласно гипотезе об антиоксидантной роли метионинов (Bender et al., 2008), эти АКО могли быть движущей силой эволюции. Те линии млекопитающих, которые демонстрируют более высокие скорости генерации АФК, могли бы подвергаться более высокому селективному давлению для увеличения содержания метионина в их митохондриальных белках (Aledo, 2019). Другими словами, если остатки метионина в митохондриальных белках служат ловушками АФК, тогда белки животных, подвергшихся высокому окислительному стрессу, должны “накапливать” метионин более эффективно, чем их ортологические белки видов, подвергшихся более низкому окислительному стрессу. Чтобы подтвердить эту гипотезу, был проведен метаанализ митохондриальных геномов видов млекопитающих, используя продолжительность жизни как обратный показатель скорости продукции АФК (Aledo et al., 2011). Проведенный анализ показал, что кодируемые митохондриями полипептиды короткоживущих видов, подвергшиеся высокому окислительному стрессу, избирательно накапливали метионины по сравнению с их долгоживущими аналогами, не находящимися в среде с высокой генерацией АФК (Aledo et al., 2011), что предполагает роль естественного отбора в поддержании метионина в белках (Aledo et al., 2012).

*Регуляция антиоксидантного статуса белков метионинсульфоксид редуктазами*

Активность метионинсульфоксид редуктаз (MSR) прямо связана с их способностью восстанавливать окисленные метионины и, тем самым, обеспечивать клеткам высокую толерантность к окислительным воздействиям. Было установлено, что мутации, приводящие к снижению активности MSR, вызывают снижение устойчивости некоторых клеток к окислительному стрессу, тогда как мутации, приводящие к перепроизводству активности MSR, способствуют увеличению устойчивости к окислительному стрессу (Grune et al., 2013). Важность MSR в старении была подчеркнута результатами исследований, показывающих, что избыточная экспрессия гена MSR-A в дрожжах (Moskovitz et al., 1998), нейрональных клетках PC-12 и человеческих Т-клетках (Yermolaieva et al., 2004), дрозофиле (Ruan et al., 2002) вызывает повышенную устойчивость к окислительному стрессу. Более того, гиперэкспрессия MSR у дрозофилы приводит к почти удвоению максимальной продолжительности жизни (Ruan et al., 2002). Этот эффект MSR на продолжительность жизни подтверждается исследованиями, результаты которых свидетельствовали о том, что мутантные штаммы дрожжей (Moskovitz et al., 1997), бактерий (Douglas et al., 2004) и мышей (Moskovitz et al., 2001), у которых отсутствует ген MSR-A, были более чувствительны к окислительному стрессу.

*Стереоспецифичное фермент-катализируемое окисление метионина*

Взаимопревращение Met и MetO *in vivo* представляет собой процесс, включающий две разные реакции окисления и восстановления. Эти окислительно-восстановительные реакции могут быть катализированы ферментами. Образование метионинсульфоксида может быть катализировано, по меньшей мере, двумя различными ферментами. Метионинсульфоксид редуктаза А (MSR-A, бифункциональный фермент), катализируя реакцию окисления, образует S-эпимер метионинсульфоксида. В этой связи интересно отметить, что метионинсульфоксид редуктаза В, в отличие от MSR-A, не проявляет способности катализировать окисление остатков метионина в белках (Lim et al., 2011). Соответствующая схема реакций окисления и восстановления метионина, катализируемых различными ферментами представлена на рис. 1.

Фермент MICAL (Molecule interacting with CasL), принадлежащий к семейству цитоплазматических, актин-связывающих белков, которые привлекли к себе внимание как редокс-зависимые регуляторы актина, также проявляет стереоспецифичность и катализирует образование R-эпи-

мера метионинсульфоксида (Manta, Gladyshev, 2017). В следующем разделе ферментативное окисление метионинов во внутриклеточных белках будет проанализировано более детально.

Таким образом, окисление метионина во внутриклеточных белках имеет многофакторную природу и, без сомнения, наличие антиоксидантных метионинов может в значительной степени обуславливать резистентность белков к окислительному стрессу.

*Необратимое окисление метионинов в плазменных белках*

Что касается внеклеточных белков и, в частности, белков плазмы крови, окисление которых будет анализироваться в отдельном разделе, они подвергаются атаке различными окислителями, генерируемыми, главным образом, лейкоцитами и тромбоцитами (Ланкин и др., 2001; Гривенникова, Виноградов, 2013). Полагают, что уровень окислителей в плазме крови, по крайней мере, не ниже такового в клетках (Bruschi et al., 2013). Плазма крови содержит ряд низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбат, урат, глутатион и др.), а также антиоксидантные белки — церулоплазмин, трансферрин, альбумин. Однако следует отметить, что вне клеток уровни глутатиона и антиоксидантных ферментов слишком низки, чтобы обеспечить адекватную защиту самих белков от вредного действия метаболитов кислорода (Bruschi et al., 2013). В литературе имеются ограниченные данные, касающиеся репарации белков по механизму тиол-дисульфидного обмена, происходящего в жидкой фазе. Одним из ярких примеров восстановления окисленного белка в плазме является регуляция активности тканевого фактора с помощью секретируемого тиоредоксина-1 (Wang et al., 2013). Однако до настоящего времени не появилось ни одного сообщения об обратимом окислении метионина (Griffiths et al., 2014). Это подразумевает, что функционально значимые или антиоксидантные метионины в плазменных белках могут подвергаться окислительным модификациям без возможности восстановления в исходную форму.

Следовательно, накопление окисленных белков в кровотоке может происходить как из-за избыточного производства АФК, так и из-за неадекватного восстановления поврежденных молекул. Это подразумевает, что белки плазмы не могут быть защищены антиоксидантами от вовлечения в окислительную модификацию в той же степени, как они были бы защищены внутри клеток. Другими словами, способность белков плазмы перехватывать молекулы окислителей без повреждения их структуры и функции вследствие необратимого окисления остатков метионина, по-видимому, очень ограничена.

## АНТИОКСИДАНТНАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ МЕТИОНИНА ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКАХ

Проводимые в течение многих лет исследования MSR-A- и MSR-B-зависимого восстановления окисленных белков демонстрировали важную роль редуктаз в поддержании устойчивости белков, клеток, тканей и организмов к окислительному стрессу как *in vitro*, так и *in vivo* (Grune et al., 2013). Ряд внутриклеточных белков содержит уязвимые к окислению метиониновые остатки с потенциальной регуляторной ролью, которые способны к каталитическому восстановлению. Все больше данных подтверждают дополнительную исключительную функцию редуктаз, связанную с регуляцией функции белка, посредством обратимого окисления метионина, контролируя тем самым различные биологические процессы. В этой части обзора мы рассмотрим два белка — актин и кальмодулин, кардинально различающихся по своей структуре и функции и достаточно полно охарактеризованных в отношении редокс-активных метионинов.

### *Обратимое окисление метионина в регуляции сборки F-актина*

Актин, образующий шесть изоформ актина:  $\beta$ - и  $\gamma$ -мышечные,  $\alpha$ -скелетные,  $\alpha$ -сердечные и  $\alpha$ - и  $\gamma$ -гладкие мышечные изоактины, является одним из наиболее функционально разнообразных белков в эукариотических клетках. Актин вовлекается во многие важные клеточные процессы, включая сокращение мышц, подвижность клеток, деление клеток, цитокинез и др. (Simiczyjew et al., 2017). Актин связывает АДФ/АТФ и  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ , и это связывание регулирует полимеризационные свойства актина, включая способность отдельных мономеров белка (G-актин) полимеризоваться и образовывать филаменты. Сборка филаментов актина (F-актин) и его разборка с образованием исходного G-актина являются витальными для нормального функционирования клеток.

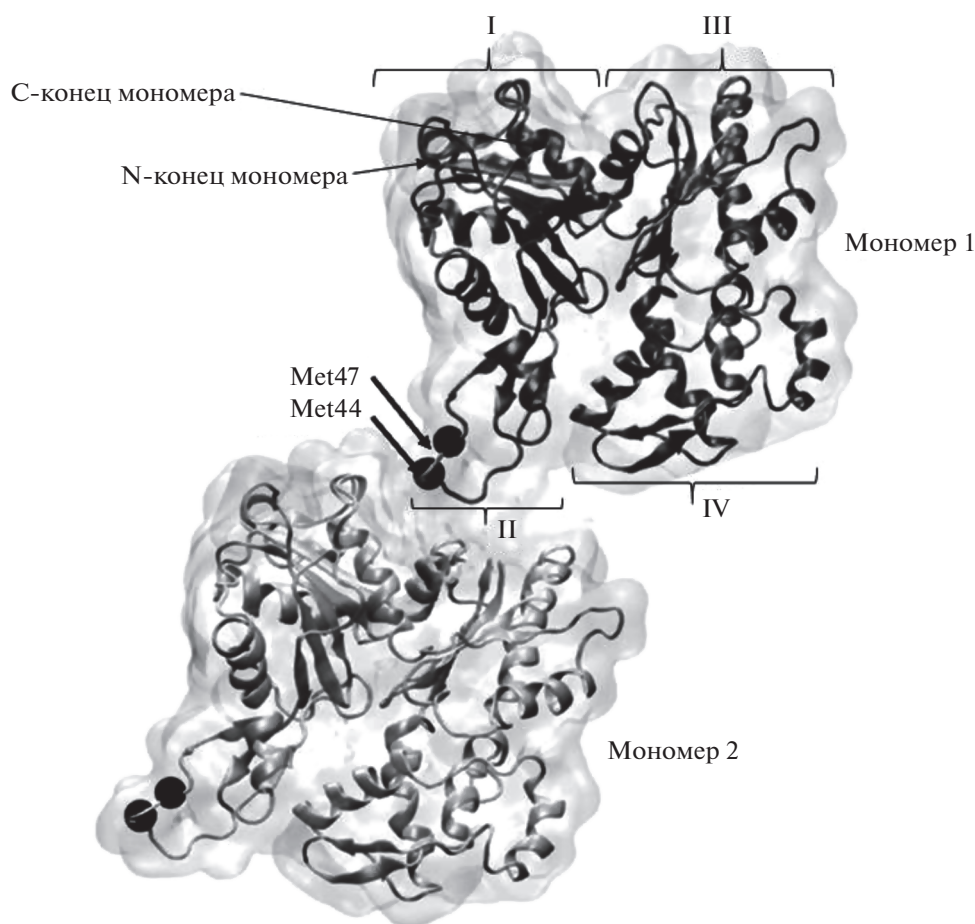
Актиновый цитоскелет представляет собой уязвимую мишень для клеточного окислительного стресса (Le-Donne et al., 2001). Актин подвержен окислению различными окислителями, в частности, пероксидом водорода и гипохлоритом ( $HOCl/OCl^-$ ). Как было установлено, шесть цистеинов в  $\beta/\gamma$ -актине (Cys10, Cys217, Cys257, Cys285, Cys272 и Cys374) и пять цистеинов в  $\alpha$ -актине (те же, что и в  $\beta/\gamma$ -актине за исключением Cys272) могут быть вовлечены в окисление, причем Cys374 является наиболее редокс-чувствительным остатком (Wilson et al., 2016). В целом полагают, что окисление цистеинов замедляет полимеризацию/деполимеризацию G-актина (Wang et al., 2001) и делает F-актин более

хрупким (Stournaras et al., 1990). Эти данные указывают на то, что окисление играет ключевую роль в разборке актомиозинового комплекса во время клеточной адгезии.

Модельные исследования *in vitro* выявили воздействие перекиси водорода на мономерный актин, приводящее к превращению 6 из 16 метионинов в метионинсульфоксиды. Хотя начальным эффектом действия  $H_2O_2$  на актин было окисление Cys374, было показано, что Met44, Met47, Met176, Met190, Met269 и Met355 были также вовлечены в окисление, причем Met44 и Met47 проявляли наибольшую уязвимость к окислению (Milzani et al., 2000). Окисленные метионины находились во всех четырех субдоменах актина: MetO355 — в первом субдоме; MetO44, MetO47 — во втором субдоме; MetO176 — в третьем субдоме; MetO190, MetO269 — в четвертом субдоме. Структура субдомена 1 является критической областью для связывания различных белков с актином, тогда как субдомен 2 играет важную роль в процессах полимеризации и стабилизации актиновых филаментов. Поэтому не удивительно, что окисление вызывало нарушения функциональных свойств актина (Hung et al., 2011). К этому следует добавить, что шесть остатков метионина, Met82, Met119, Met123, Met132, Met299 и Met313 локализованы полностью в гидрофобном ядре молекулы актина, в то время как относительная доступность к растворителю других частично экспонированных остатков метионина располагалась в ряду: Met47 > Met355 > Met44 > Met227 > Met283 > Met269 > Met325 > Met176 > Met305 > Met190. Результаты показывают, что  $H_2O_2$ -индуцированная окислительная модификация отдельных метионинов не связана напрямую с их пространственным расположением, что является следствием изменений в третичной структуре актина, вызванных окислением метионинов (Milzani et al., 2000) или эффектом “кооперативности” при окислении остатков метионина в белке (Walker et al., 2019).

Окисление остатков метионина в актине Met44 и Met47 может также осуществляться ферментативным способом (Wilson et al., 2016). Это окисление, как упоминалось ранее, опосредуется семейством белков, называемых MICAL, которые включают монооксигеназный домен, способствующий превращению метионина в метионинсульфоксид (Hung et al., 2011). В присутствии кофермента NADPH MICAL добавляет кислород к остаткам Met44 и Met47 на F-актине. MICAL окисляет эти два остатка стереоспецифично в R-конформации и генерирует актин Met44-R-сульфоксид и Met47-R-сульфоксид (Hung et al., 2013).

Несмотря на то, что остаток Met44 локализован внутри структуры F-актина, благодаря конформационным перестройкам при взаимодей-



**Рис. 2.** Структурная модель молекулы актина. Остатки Met44 и Met47, окисляемые MICAL, находятся на границе раздела между соседними мономерами актина (PDB ID: 2ZWH) (Oda et al., 2009), каждый из которых состоит из I, II, III и IV субдоменов. MICAL специфически окисляет остатки актина Met44 и Met47 (Hung et al., 2011), причем основным средством, с помощью которого MICAL вызывает разборку F-актина, является окисление остатка Met44. Окисление Met44 и Met47 способствует существенному ослаблению межмолекулярных взаимодействий и последующей диссоциации димера (адаптировано по: Milzani 2000 et al.; Hung et al., 2013; Wilson et al., 2016).

ствии молекул фермента и актина, активный сайт MICAL получает доступ к плохо доступному метионину (Wilson et al., 2016). Ключевой остаток Met44 находится в D-петле части субдомена II актина, что имеет решающее значение для межмолекулярных контактов субъединиц актина (Wilson et al., 2016). В этой связи, окисление Met44, но не Met47, по-видимому, является доминирующим фактором для процесса деполимеризации F-актина (Grintsevich et al., 2016), потому что мутанты актина Met44Leu устойчивы к разборке, вызванной MICAL, а мутанты Met47Leu – нет (Grintsevich et al., 2017).

На рис. 2 показано расположение Met44 и Met47 в димере актина, индуцированное окисление которых вызывает ослабление межмолекулярных контактов, что способствует диссоциации димера на два мономера. Образующиеся мономеры

актина медленнее собираются и подвержены более легкой фрагментации после повторной сборки.

Взаимодействия кофилина (белка, способного связываться с G- и F- актином) и модифицированного актина усиливают склонность F-актина к деполимеризации, способствуя образованию мономерного актина при окислении под действием MICAL (Wilson et al., 2016). Кроме того, MICAL-катализируемое окисление актина способствует высвобождению кофилина, обеспечивая тем самым надежный механизм разборки различных форм актина в ответ на передачу сигналов клетками (Xu et al., 2017). MICAL-опосредованное влияние на динамику актина обратимо с помощью ферментов метионинсульфоксид редуктаз, и под действием метионинсульфоксид-редуктазы B1 (MSR-B1) Met44- и Met44-R-сульфоксиды восстанавливаются в исходный метионин (Hung et al., 2013).

Таким образом, MICAL-индуцированное окисление Met44 в актине, вызывающее деполимеризацию F-актина, и обратное превращение MetO44 в исходную форму метионина, катализируемое метионинсульфоксид редуктазой MSR-B, которое восстанавливает способность G-актина к полимеризации, демонстрируют уникальный способ ферментативной редокс-регуляции сборки и разборки надмолекулярной структуры актинового волокна.

#### *Окислительная модификация кальмодулина*

Кальмодулин (CaM) является небольшим белком (148 аминокислотных остатков) и рассматривается как наиболее важный сенсор  $\text{Ca}^{2+}$  (Chin, Means, 2000). Регуляция цитоплазматической концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  является повсеместным механизмом, посредством которого клетки преобразуют внешние сигналы в биологические ответы. Каскад сигналов, инициируемый повышением  $\text{Ca}^{2+}$ , часто опосредуется  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками, такими как кальмодулин. CaM связывает и активирует более 300 известных белков-мишеней (Tebar et al., 2020), включая кальмодулин-зависимые протеинкиназы и фосфатазы, цитоскелетные белки, ионные каналы и насосы (Chyan et al., 2017). CaM содержит два глобулярных домена, соединенных длинной и гибкой  $\alpha$ -спиралью, называемой “центральной линкером”. Каждый домен содержит два  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих сайта, имеющие структурный мотив: спираль-петля-спираль (EF-hand) (Liu et al., 2020; Tebar et al., 2020). Хотя эти два домена обладают высокой степенью гомологии в последовательности, они демонстрируют тонкие различия в структурах и аффинности к  $\text{Ca}^{2+}$  (Gifford et al., 2007). Взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с CaM запускает в белке конформационные изменения, приводящие к открытию гидрофобных карманов и готовности к ассоциации с различными белками-мишенями (Gifford et al., 2007). Другими словами,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM связывается с белками-мишенями с существенно более высокой аффинностью по сравнению с CaM в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  (апо-CaM).

CaM имеет необычно высокое содержание метионина (9 метиониновых остатков), включая 46% гидрофобных остатков в карманах связывания, которые имеют решающее значение для взаимодействия CaM с белками-мишенями (Vetter, Leclerc, 2003; Yamniuk, Vogel, 2004). Остатки метионина в кальмодулине, которые являются критическими для межбелкового взаимодействия, являются потенциальными мишенями для окисления (Lim et al., 2013). Окисление метионина в кальмодулине, имитируемое замещением метионина глутамином (M109Q и M124Q), уменьшает влияние ионов кальция на структуру CaM, в

первую очередь, за счет уменьшения константы равновесия от закрытой к открытой конформации в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ . Предполагается, что окисление метионина изменяет взаимодействие CaM с белками-мишенями, нарушая этот  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый структурный сдвиг (McCarthy et al., 2015).

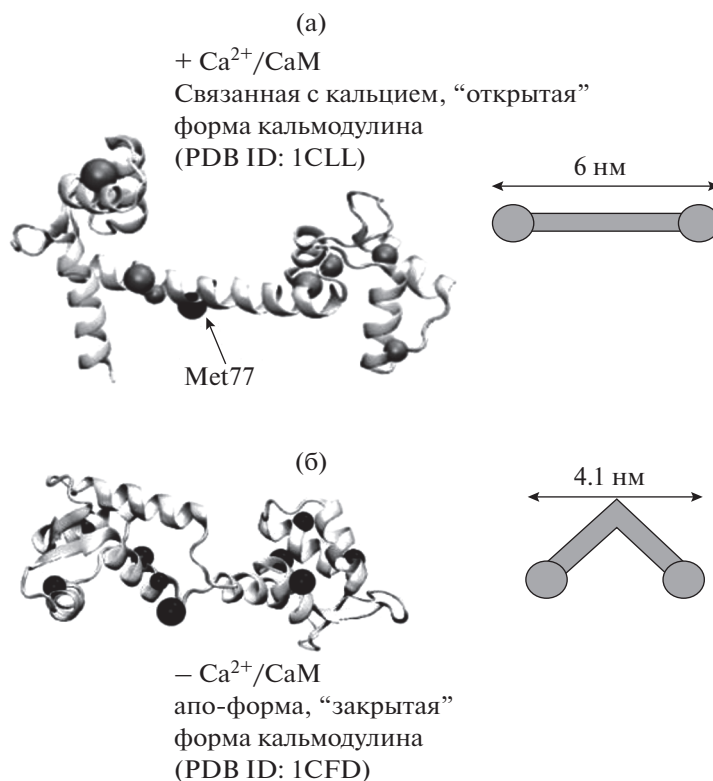
Поскольку CaM не содержит остатков Cys, окисление остатков метионина играет важную роль в нарушении метаболизма кальция. Например, превращение в кальмодулине Met144 и Met145 в MetO нарушает CaM-зависимую активацию как саркоплазматической, так и эндоплазматической  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (Chen et al., 2005).

Как упоминалось выше, MSR-A способна осуществлять ферментативное окисление, атакуя свободные метионины или остатки метионина в пептидах и белках до MetO (Lim et al., 2013). CaM является субстратом для MSR-A с интригующей специфичностью. В отличие от  $\text{H}_2\text{O}_2$ - или  $\text{HOCl}/\text{OCI}^-$ -индуцированного окисления CaM, способного модифицировать каждый из 9 имеющихся остатков метионина, MSR-A стереоспецифически окисляет единственный метионин — Met77 (рис. 3а) до MetO (Lim et al., 2013). Остаток Met77 находится в карбоксильной части центрального линкера. Согласно кристаллической структуре белка, центральный линкер представляет собой жесткую спираль. Однако исследования ЯМР показывают, что он достаточно неупорядочен и гибок в растворе (Barbato et al., 1992). Связывание кальция кальмодулином стабилизирует структуру его центрального линкера в последовательности между Met77 и Ser82 (Qin, Squier, 2001), предположительно, способствуя сайт-специфическому окислению Met77 метионинсульфоксид редуктазой А (Lim et al., 2013). Кристаллическая структура CaM свидетельствует, что Phe12 и атом серы в Met77 расположены на расстоянии 5.6 Å друг от друга, образуя, таким образом, уникальный метионин-ароматический мотив, который играет важную роль в стабилизации белковых структур и межбелковых взаимодействий (Walgenbach et al., 2018). Как полагают авторы (Qin, Squier, 2001), окисление Met77 может нарушить связывание мишеней с комплементарными  $\text{NH}_2$ -участками CaM.

При действии метионинсульфоксид редуктазы А в направлении восстановления окисленный CaM полностью восстанавливается до своей нативной формы. На основании этого был сделан важный вывод, что обратимая ковалентная модификация Met77 может регулировать взаимодействие CaM с одной или несколькими его мишенями (Lim et al., 2013).

Описанное выше сайт-специфическое окисление Met77 относится к  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM, то есть в форме, связанной с кальцием. Удаление кальция с по-





**Рис. 3.** Ферментативное окисление аминокислотных остатков метионина в Ca<sup>2+</sup>/CaM и апо-кальмодулине. Селективное ферментативное окисление метионина Met77 в Ca<sup>2+</sup>/CaM (PDB ID: 1CLL), катализируемое MSR-A (а); окисление всех девяти имеющихся остатков метионина в апо-кальмодулине (PDB ID: 1CFD) MSR-A (б). Структурные изменения в молекуле CaM при окислительной модификации метионина не показаны (адаптировано по: McCarthy et al., 2015).

лучением апо-кальмодулина вызывает большие изменения в его третичной структуре, которые включают изменения экспозиции остатков метионина как в amino-, так и в карбоксильном кальций-связывающих доменах (Vetter, Leclerc, 2003). Вследствие этого специфичность, присущая кальций-связанному кальмодулину, терялась в апо-форме белка, и большинство молекул содержало множественные остатки MetO. Все 9 остатков метионина были окисляемыми (рис. 3б), хотя Met110 и Met145 окислялись наиболее быстро. Однако окисление оставалось стереоспецифичным при генерировании MetO, о чем свидетельствовала способность MSR-A полностью восстанавливать все MetO в окисленном апо-кальмодулине (Lim et al., 2013). Относительно недавно, тестируя созданных мутантных мышей, у которых CaM дикого типа был заменен CaM, содержащим имитатор метионинсульфоксида 77 (M77Q), было показано, что обратимое окисление метионина 77 в кальмодулине под действием MSR-A может в значительной степени регулировать клеточные функции (Mari-moutou et al., 2018).

#### *Антиоксидантные метионины во внутриклеточных белках*

Целый ряд внутриклеточных белков содержит антиоксидантные метионины, окисление которых не влияет или влияет очень слабо на биологическую активность белка.

Ярким примером этого послужило исследование пероксид-индуцированного окисления глутаминсинтетазы, демонстрирующее, что 8 из 16 остатков метионина могут быть окислены без потери каталитической активности. Картирование окисляемых остатков метионина показало, что все они были поверхностно-экспонированными и, наоборот, остатки, которые оставались неокисленными, были локализованы внутри белковой глобулы (Lim et al., 2019). Более детальное изучение топографического распределения окисляемых остатков метионина обнаружило удивительную картину: эти остатки выстилали участок, ведущий от поверхности фермента к его активному центру. Другими словами, эти остатки метионина собирались строго определенным образом, охраняя активный сайт и действуя как макромолекулярные ловушки АФК (Lim et al., 2019).

При исследовании чувствительности рекомбинантных белков, интерферона и тканевого активатора плазминогена, вовлекаемых в индуцированное окисление трет-бутилгидропероксидом, удалось показать, что два из пяти остатков метионина в интерфероне и три из пяти остатков метионина в молекуле тканевого активатора плазминогена могут быть окислены без потери биологической активности белков (Kesk, 1996). Это, по мнению авторов, свидетельствовало о поверхностной локализации этих метионинов (Kesk, 1996). Сходный результат был получен при окислении фактора роста кератиноцитов (Spahr et al., 1996).

Изучение  $H_2O_2$ -индуцированного окисления рекомбинантного фактора стволовых клеток человека, содержащего пять остатков метионина, показало, что Met1, Met27 и Met15 были высокоуязвимыми к окислительной модификации с незначительным влиянием на биологическую активность, а это признак того, что эти метионины являются поверхностно-экспонированными (Hsu et al., 1996). Оставшиеся два остатка, Met36 и Met48, были гораздо менее подвержены окислению, и окислительная модификация любого остатка сопровождалась значительной потерей биологической активности. Очевидно, что Met36 и Met48 погружены внутрь белковой глобулы и такие метионины, как правило, наделены функциональной активностью.

15-липоксигеназы млекопитающих подвергаются необратимой ауто-инактивации во время каталитического цикла. Фермент содержит множественные метионины, и окисление только одного метионина вблизи активного сайта каталитического домена очень хорошо коррелирует с инактивацией белка. Хотя это может быть регуляторным механизмом, было показано (Gan et al., 1995), что замена сайт-специфического окисляемого метионина Met590 на лейцин приводит к форме фермента, который, по-прежнему, способен к аутоинактивации. Исходя из этих результатов, было предположено, что Met590 является антиоксидантом, защищающим активный сайт белка (Moskovitz et al., 2000).

Признавая химическую легкость окисления метионинов, метионины, находящиеся на поверхности, представляют собой грозный механизм антиоксидантной защиты, способный защищать критические остатки внутри белка, а также другие клеточные компоненты. Поскольку метионинсульфоксид редуктазы могут восстанавливать MetO до метионина, эта антиоксидантная защита приобретает особую каталитическую эффективность. Один из таких примеров функционирования системы принадлежит авторам (Garner et al., 1998), которые установили, что липопотеины высокой плотности восстанавливают токсичные

продукты окисления холестерина до спиртов с сопутствующим окислением двух метиониновых остатков до сульфоксидов. В свою очередь, другие авторы показали (Sigalov, Stern, 1998), что система может функционировать каталитически, поскольку окисленный аполипопротеин может быть восстановлен метионинсульфоксид редуктазой.

В заключение хотелось бы отметить следующее. В данном разделе мы ограничились лишь некоторыми примерами участия антиоксидантных метионинов в сохранении функциональности внутриклеточных белков, (дополнительные примеры можно найти в работах (Moskovitz et al., 2000; Grune et al., 2013; Gu et al., 2015)). Что касается ферментативного восстановления метионинсульфоксидов, необходимо учитывать, что вклад метионинов в белках как антиоксидантов, нейтрализующих АФК, может быть в определенной мере ограниченным. Оба типа MSR действуют более эффективно в восстановлении развернутых, а не свернутых окисленных белков, и этот эффект обусловлен лучшим доступом ферментов к метионин сульфоксидам, присутствующим в гидрофобных ядрах субстратных белков (Taggato et al., 2012). Однако окисление точечного экспонированного метионина может не сопровождаться разворачиванием структуры белка. Тем не менее, концепция, декларирующая, что поверхностно-расположенные в белках метионины представляют собой эндогенные антиоксиданты, а взаимопревращение Met/MetO, которое имеет решающее значение для клеточной физиологии, обеспечивает селективный способ точной регуляции функции белка, является в настоящее время наиболее продуктивной и обоснованной в понимании функционирования белков и клеток при генерации АФК (Drazic, Winter, 2014).

#### ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ МЕТИОНИНОВ ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКАХ

Как указывалось выше, из-за отсутствия в плазме крови метионинсульфоксид редуктаз не обнаружено ни одного случая восстановления окисленных форм метионинов (Griffiths et al., 2014). Однако, так как метионины являются наиболее высокореакционными в окислительных реакциях с АФК, по сравнению со всеми остальными аминокислотами (за исключением цистеина), это позволяет экспонированным метионинам перехватывать АФК и тем самым служить эндогенными антиоксидантами во внеклеточных белках. Количество таких антиоксидантных метионинов во многом определяет антиоксидантную «емкость» белка, его окислительную резистентность, то есть его способность противостоять токсическому действию молекул окислителей.



*Окислительная модификация  
 $\alpha_2$ -макроглобулина человека*

Интригующие данные, полученные авторами при исследовании окислительной модификации человеческого  $\alpha_2$ -макроглобулина ( $h\alpha_2M$ ) (Reddy et al., 1994), убедительно продемонстрировали существование некоторых остатков метионина в белке, окисление которых не влияло на его активность. Последующее наблюдение превращения (в определенных положениях) метионинов в метионинсульфоксиды в других белках, которое не оказывало заметного воздействия на функциональные свойства этих белков, привело к становлению более общей гипотезы, согласно которой метионины, локализованные на поверхности белка, могут быть ловушками АФК и, следовательно, действовать как эндогенные антиоксиданты (Lim et al., 2019).

Молекула  $h\alpha_2M$  обладает четвертичной, гомотетрамерной структурой, которая образована четырьмя идентичными субъединицами, собранными в два дисульфид-связанных димера, удерживаемых вместе нековалентными силами (Marrero et al., 2012). Каждая субъединица  $h\alpha_2M$  содержит 25 остатков метионина, которые присутствуют во всех структурных областях белка.  $h\alpha_2M$  наделен множеством функций, в частности, необратимо ингибирует огромное разнообразие протеиназ независимо от механизма их действия или специфичности, включая серин-, цистеин-, аспарагин- и металлопротеиназы (Rehman et al., 2013).

Исследования окисления  $\alpha_2$ -макроглобулина при действии на него различных видов АФК показало, что перекись водорода или супероксидный анион-радикал не влияли на его структуру и функцию (Lim et al., 2019). Гипохлорит и гидроксильные радикалы — оба были способны модифицировать аминокислотные остатки в  $\alpha_2$ -макроглобулине, однако только гипохлорит мог вызывать потерю белком способности ингибировать протеиназы (Khan et al., 2009). Многие функции  $\alpha_2$ -макроглобулина регулируются гипохлоритом. Индуцированные гипохлоритом химические и структурные модификации  $h\alpha_2M$  человека усиливают его активность как шаперона (Dahl et al., 2015), влияют на способность белка связывать цитокины и факторы роста (Wu et al., 1998) и др. Доказательства гипохлорит-индуцированной регуляции функций  $h\alpha_2M$  и возможные последствия этого в протекании различных физиологических и патологических процессов были суммированы в недавно опубликованной обзорной работе (Carter et al., 2019).

Детальное изучение реакции окисления белка установило, что каждая субъединица  $h\alpha_2M$  потребляет восемь молей N-хлорамина без потери

ингибиторной, антипротеиназной активности (Reddy et al., 1994). Потребление восьми эквивалентов хлорамина вызывало окисление восьми остатков метионина с превращением их в сульфоксиды метионина. Продолжение воздействия способствовало окислению шести дополнительных остатков метионина и одного ключевого, в функциональном отношении остатка триптофана Trp436, что обуславливало инактивацию белка (Reddy et al., 1994; Lim et al., 2019). Окисление метионинов в значительной степени было ответственно за гипохлорит-индуцированную диссоциацию тетрамера  $h\alpha_2M$  на димеры. Хотя точную локализацию окисленных остатков метионинов еще предстоит установить, предполагается, что некоторые из них локализованы в области так называемого bait-domain (Wyatt et al., 2015). Этот домен содержит большое количество пептидных связей, доступных для гидролитического расщепления различными протеиназами (Wyatt et al., 2014) и, кроме того, он изобилует множественными метионинами: Met607, Met666, Met673, Met688, Met697 и Met713. Поскольку в нативном тетрамере два метионина, Met697 и Met713 локализованы внутри гибкого сегмента bait-domain и находятся на границе раздела нековалентно-связанных  $h\alpha_2M$ -димеров (Marrero et al., 2012; Wyatt et al., 2015), было высказано предположение, что эти метионины могут быть наиболее легкодоступными для молекул гипохлорита, и их окисление может способствовать диссоциации тетрамера (Rosenfeld et al., 2018).

В целом  $\alpha_2$ -макроглобулин остается все еще крайне плохо изученным белком в отношении идентификации его аминокислотных остатков, которые подвергаются окислительным модификациям под действием АФК. Точные положения модифицированных остатков метионинов, подвергающиеся атаке гипохлоритом, остаются неизвестными. Картирование метионинов, вовлекаемых в окислительную модификацию, используя масс-спектрометрический метод, крайне необходимо в будущем, чтобы заполнить важный пробел в понимании механизма окисления этого многофункционального белка и в возможной антиоксидантной роли конкретных метионинов, защищающих ключевой остаток Trp436.

Накопленные данные по окислению  $\alpha_2$ -макроглобулина оказались знаковыми. Они свидетельствовали о том, что метионины во внеклеточном белке могут также служить линией обороны без их ферментативного восстановления. Кроме того, количество антиоксидантных метионинов в белке во многом определяет его толерантность к окислителям, что приобретает особую значимость при функционировании белка *in vivo* в условиях развития окислительного стресса. И, наконец, окисление плазмменных белков не является одно-

значно деструктивным, а может выполнять регуляторную роль.

### *Окисление остатков метионина в антитромбине III*

АФК может способствовать прокоагулянтному состоянию крови за счет окислительных модификаций белков, участвующих в коагуляции (Gutmann et al., 2020; Wang, Zennadi et al., 2020).

Антитромбин III (АТIII) принадлежит к широкому семейству ингибиторов сериновых протеаз (серпины). АТIII является наиболее важным физиологическим ингибитором в процессах коагуляции, ингибируя активность прокоагулянтных протеаз, которые участвуют как во внутреннем пути, так и во внешнем пути свертывания крови (Olson et al., 2004). Эффективность процесса инактивации антитромбином целевых протеаз зависит от связывания им кофактора — гепарина (Rau et al., 2007).

Антикоагулянтная активность АТIII, главным образом, опосредуется способностью экспонированной, то есть находящейся в открытой конформации, центральной реактивной петли серпина (RCL, reactive centre loop), включающей остатки Ala383–Val400, захватывать молекулу тромбина. В результате атаки реактивной петли АТ каталитическим центром тромбина Ser195 пептидная связь Arg393–Ser394 разрывается, и происходит образование необратимого неактивного комплекса (Olson, Björk, 1994). Каталитическая архитектура тромбина разрушается, то есть происходит потеря его упорядоченной структуры, вследствие чего протеаза теряет врожденное свойство взаимодействовать с ее субстратами (Rau et al., 2007). Конформационная подвижность RCL обеспечивается связыванием гепарина с гепарин-связывающим доменом АТ.

Как было установлено, гепарин-связывающая способность антитромбина снижается после его окисления перекисью водорода (van Patten et al., 1999) или перекисью липидов (De Cristofaro, Landolfi, 2000). АФК может нарушать взаимодействие между тромбином и комплексом АТIII–гепарин (Gray, Barrowcliffe, 1985) и, кроме того, дополнительно снижать гепарин-связывающую способность антитромбина.

АТ оказался уязвимым к окислению хлорамином, причем инактивация ингибитора прямо коррелировала с дозой окислителя (Stief et al., 1988). В той же работе была исследована хлорамин-индуцированная инактивация двух других ингибиторов сериновых протеаз — альфа-1-протеиназы (A1-P1) и ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1), для которых удалось показать, что механизм инактивации заключается в превращении метионина в метионинсульфоксид

в реактивном центре этих белков. Сопоставление эффектов окисления на функциональные свойства АТ, не имеющего остатков метионина в структуре RCL, и A1-P1, PAI-1, дало авторам основание предположить, что окисление, по-видимому, является общим механизмом изменения баланса между сериновыми протеазами и их ингибиторами в пользу протеаз (Stief et al., 1988).

АТ содержит 12 метионинов, четыре из которых расположены наиболее близко к поверхности белка. В трехмерной структуре два из этих остатков метионина, Met314 и Met315, расположены рядом с RCL АТ. Еще два экспонированных метионина, Met17 и Met20, находятся в непосредственной близости с участком связывания АТ с гепарином (Carrell et al., 1994). Детальное исследование возможной роли метионинов в окислительной модификации АТ, обработанного перекисью водорода, было выполнено с привлечением метода масс-спектрометрии (van Patten et al., 1999). Было обнаружено, что Met314 и Met315 являются наиболее чувствительными к окислению, но их окисление не влияло ни на антитромбиновую активность, ни на связывание гепарина. Метионины в положениях 17 и 20 были более резистентными к окислению. Их модификация происходила только при значительно более высоких концентрациях пероксида и сопровождалась снижением аффинности к гепарину. Однако при насыщающих концентрациях гепарина активность только незначительно снижалась для этих сильно окисленных образцов АТ. Структурные исследования выявили интересную особенность, что высокоокисленный АТ является менее склонным подвергаться значительным конформационным изменениям, вызванным гепарином, наиболее вероятно, из-за окисления Met17. На основании полученных результатов авторы сделали вывод (van Patten et al., 1999), что поскольку этого не происходит в менее окисленных и, по-видимому, более физиологически значимых формах АТ, окисление не является средством контроля активности АТ.

Таким образом, мы можем констатировать, что молекула АТ обладает, по крайней мере, двумя антиоксидантными метионинами, Met314 и Met315 (van Patten et al., 1999), препятствующими окислительному повреждению структуры петли, жизненно важной для экспрессии функции белка.

### *Антиоксидантные метионины в структуре коагуляционного фактора крови XIII*

Коагуляционный фактор крови XIII (FXIII) является крайне мало изученным белком в отношении подверженности его окисленной модификации. Только относительно недавно были начаты исследования в этом направлении. В данном раз-

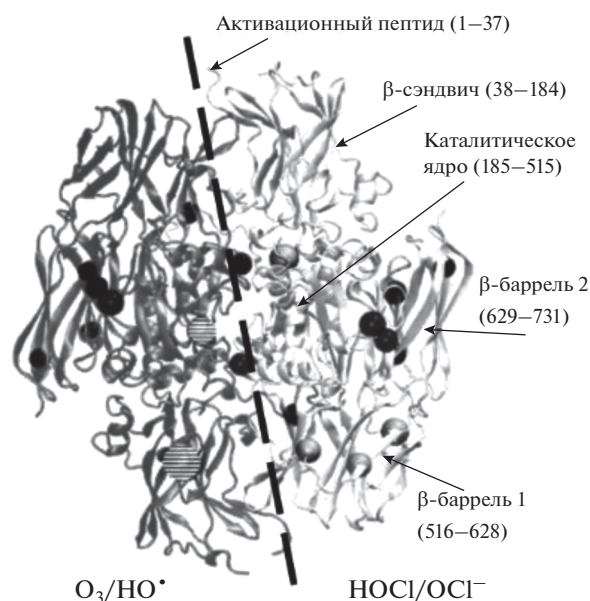
деле суммированы результаты по антиоксидантной роли метиониновых остатков в этом белке.

FXIII играет ведущую роль в поддержании процессов коагуляции и фибринолиза. Он осуществляет как ковалентное сшивание фибриновых полимеров, являющихся матрицей кровяного сгустка, так и сшивание фибрина с белками фибринолитической системы.

FXIII представляет собой гетеротетрамерный профермент FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, который состоит из двух каталитических субъединиц А (FXIII-A) и двух идентичных регуляторных субъединиц В (FXIII-B). Все четыре субъединицы скреплены нековалентными связями. Каталитическая полипептидная цепь образует пять различных структурных доменов: N-концевой участок длиной 37 аминокислот на субъединице FXIII-A, называемый пептидом активации (FXIII-AP), β-сэндвич, каталитический домен, содержащий активный сайт (остатки Cys314, His373 и Asp396) и домены β-баррель 1 и β-баррель 2 (Bagoly, Muszbek, 2019). β-Сэндвич-домены и домены β-баррель 1 и β-баррель 2 почти полностью состоят из структур типа β-sheet с небольшим включением α-спиралей в сэндвич-доменах и β-баррель 1. Каталитический домен содержит структуры как β-складчатых листов, так и α-спирали. Пространственная структура димера каталитических субъединиц FXIII, полученная на основании рентгенструктурного анализа, представлена на рис. 4. Как видно из рис. 4, мономеры субъединицы FXIII-A образуют димер, напоминающий шестиугольник с симметрией C<sub>2</sub>, в котором два центральных каталитических домена окружены структурами шести β-складчатых листов.

Регуляторная субъединица свернута в 10 так называемых суши-доменов, каждый из которых содержит ~60 аминокислот и ковалентно стабилизирован парой внутренних дисульфидных связей (Souri et al., 2008). По данным электронной микроскопии субъединица В выглядит как тонкая, гибкая и изогнутая нить (Carrell et al., 1989). Однако до настоящего времени FXIII-B в кристаллической форме не получена, и достоверная информация о ее трехмерной структуре отсутствует.

Этот белок интересен не только тем, что в отличие от всех других ферментов системы свертывания крови, которые относятся к сериновым протеиназам, FXIII является членом семейства ферментов трансглутаминаз, но также и тем, что превращение профермента FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> в активную форму фермента является многостадийным процессом. Очень кратко об активации: первая стадия заключается в тромбин-катализируемом протеолитическом расщеплении связи Arg37-Gly38 на NH<sub>2</sub>-конце субъединицы FXIII-A, приводящей к высвобождению активационного



**Рис. 4.** Изображение кристаллической димерной структуры каталитических субъединиц FXIII (PDB ID: 1F13) с окислительными модификациями метиониновых остатков, обнаруженных в окисленных образцах профермента. Левый (темный) и правый (светлый) мономеры представляют собой структуру каталитической субъединицы FXIII, обработанную озоном и гипохлоритом, соответственно. Черным цветом обозначены остатки метионина, окислительные модификации которых были обнаружены в образцах как обработанных озоном, так и обработанных гипохлоритом; заштрихованы — аминокислотные остатки метионина, которые были модифицированы только при окислении озоном; серые — только для образцов, обработанных гипохлоритом.

пептида. Это расщепление вызывает превращение гетеротетрамера FXIII-A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> в гетеротетрамер FXIII-A'<sub>2</sub>B<sub>2</sub>. Вторая стадия активации обусловлена связыванием ионов кальция с FXIII-A', сопровождаемым конформационными перестройками и диссоциацией гетеротетрамера FXIII-A'<sub>2</sub>B<sub>2</sub> на димеры, субъединицы FXIII-A'<sub>2</sub> и FXIII-B<sub>2</sub>. На последней стадии активации под влиянием ионов кальция FXIII-A'<sub>2</sub> претерпевает также крупномасштабные конформационные перестройки, превращаясь в активную форму фермента, FXIII-A\* (Bagoly, Muszbek, 2019; Protopopova et al., 2019).

Проведенные масс-спектрометрические исследования озон-индуцированного окисления профермента показали, что из 18 остатков метионина, присутствующих в первичной структуре белка, 14 остатков были идентифицированы в нативном образце FXIII, и 9 из них оказались поврежденными окислением в образце FXIII, обработанном озоном. Эти остатки были лока-

лизованы в домене  $\beta$ -сэндвич (Met159), каталитическом домене (Met265, Met350, Met474, Met475 и Met499) и домене  $\beta$ -баррель 2 (Met646, Met676, Met709). Поскольку эти остатки проявляли повышенную восприимчивость к окислению, казалось, что они являются экспонированными, выполняя роль перехватчиков молекул озона. Другие пять остатков Met — Met247, Met380, Met406, Met520 и Met595 были значительно менее подвержены окислению и, как полагали авторы (Vasilyeva et al., 2018), вероятно локализованы внутри белковой глобулы и становятся экспонированными только во время конформационных перегруппировок молекулы вследствие активации.

Однако результаты более раннего исследования транслугтаминазной активности FXIII-A\*, образованного из окисленного озном профермента, свидетельствовали о том, что FXIII-A\* несколько терял в своей ферментативной активности (Rosenfeld et al., 2013). Это затрудняло точную идентификацию антиоксидантных метионинов в белке.

Опосредованное гипохлоритом окисление FXIII на разных этапах его ферментативной активации показало, что белок в форме профермента, как и в случае озона, проявлял максимальную резистентность к индуцированному окислению, в то время как фермент обнаруживал наибольшую уязвимость к гипохлориту (Vasilyeva et al., 2020). Результаты ВЭЖХ-МС/МС (высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией) выявили в проферменте, окисленном 150 мкМ гипохлоритом, целый ряд модифицированных метионинов: Met242, Met350, Met406, Met474, Met475, Met499 и Met512, Met520, Met595, Met646, Met676, Met709, принадлежащих каталитической субъединице. Так как профермент, обработанный 150 мкМ гипохлоритом, полностью сохранял свою ферментативную активность, присущую неповрежденному белку, был сделан вывод, что все вышеперечисленные метионины функционируют в качестве эндогенных антиоксидантов. Многие из этих остатков являются общими для озон-, и гипохлорит-индуцированного окисления профермента (рис. 4). В то же время, в окисленном ферменте были обнаружены два дополнительных модифицированных метионина в положениях 265 и 292, что является индикатором того, что в проферменте эти метионины находились в гидрофобном ядре субъединицы А и при активации белка они мигрировали на поверхность, становясь мишенью для молекул окислителя.

Что касается регуляторной субъединицы, в ней удалось идентифицировать несколько окисленных метионинов: Met29 — в первом суши-домене, Met94 — во втором, Met383 и Met448 — в

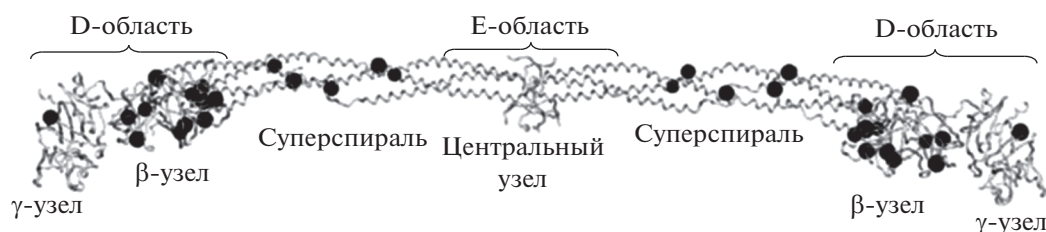
седьмом, Met441 в — восьмом. Авторы полагают, что эти метионины вносят дополнительный вклад в антиоксидантную защиту белка (Vasilyeva et al., 2020).

Совсем недавно были получены данные о том, что в образцах плазмы, собранных у здоровых добровольцев, индуцированное окисление 500 мкМ HOCl/OCl не изменяло ферментативную активность FXIII (Misztal et al., 2019). Поскольку в плазме FXIII циркулирует вместе с другими белками, превалирующими по концентрации, каждый из которых способен в той или иной степени перехватывать АФК, тем самым ограничивая окисление FXIII, можно предположить, что окислительная модификация FXIII будет затрагивать, в основном, поверхностно экспонированные аминокислотные остатки метионина (Vasilyeva et al., 2020). Физиологическая целесообразность такой антиоксидантной адаптации остается пока не вполне понятной. Полагают, что такая адаптация может быть эффективной при воспалительных процессах. В очаге воспаления локальный уровень HOCl/OCl может достигать миллимолярных концентраций (Stief et al., 2000). В плазме крови FXIII, как известно, нековалентно связан с фибриногеном (Souri et al., 2015), который, в свою очередь, путем связывания с интегрином (Mac-1), экспрессируемым на активированных лейкоцитах, обеспечивает ключевую связь между тромбозом и воспалением (Lishko et al., 2004). При высоких локальных концентрациях HOCl/OCl можно ожидать, что транслугтаминазная активность FXIII-A\*, будет снижена, что приведет к уменьшению количества  $\alpha$ -полимеров в фибриновой сети (Vasilyeva et al., 2020). Поскольку  $\alpha$ -полимеры вносят существенный вклад в устойчивость фибрина к гидролизу плазмина (Rijken et al., 2017), их уменьшающееся количество можно рассматривать как компенсаторный механизм, когда устойчивый к плазмину фибрин с аномальной структурой образуется из поврежденного окислением фибриногена.

#### *Фибриноген: окислительные модификации метионинов и функциональные последствия*

В последние годы были опубликованы прекрасные обзорные статьи, в которых дано очень подробное описание структуры и биохимии фибриногена (Kattula et al., 2017; Weisel, Litvinov, 2017). В этой связи мы практически не будем останавливаться на этих аспектах молекулы фибриногена, и каждый читатель может подчерпнуть необходимую информацию из цитируемых выше работ.

Вероятно, фибриноген является одним из наиболее изучаемых белков в отношении его окисления и функциональных последствий. Такой повы-



**Рис. 5.** Топография окисленных остатков метионина (обозначены черным цветом) в молекуле фибриногена (PDB ID: 3GHG) при его индуцированном окислении озоном, гипохлоритом и перекисью водорода. Молекула фибриногена состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых формируется тремя разными полипептидными цепями —  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  и  $\gamma$ , состоящими из 610, 461 и 411 аминокислотных остатков. Молекула фибриногена включает ряд структурных элементов: центральную область E, образованную  $\text{NH}_2$ -концевыми участками всех шести полипептидных цепей, две периферические области D,  $\text{COOH}$ -концевые участки  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей которых формируют глобулярные  $\beta$ - и  $\gamma$ -узлы. В свою очередь, области E и D связаны между собой суперспиральными сегментами, составленными из медиальных участков  $\alpha\alpha$ -,  $\beta\beta$ - и  $\gamma$ -цепей.  $\text{COOH}$ -концевые участки  $\alpha\alpha$ -цепи формируют  $\alpha\text{C}$ -область, состоящую из  $\alpha\text{C}$ -домена и гибкого  $\alpha\text{C}$ -коннектора (не показаны на рисунке).

шенный интерес к этому белку может быть обусловлен его огромной значимостью в гемостазе и во многих других физиологических и патофизиологических процессах (Kattula et al., 2017; Weisel, Litvinov, 2017), а также его наиболее высокой окислительной уязвимостью среди других белков плазмы крови (Shacter et al., 1994).

В 2012 году была опубликована работа (Weigandt et al., 2012), в которой сообщалось, что обработка фибриногена хлорноватистой кислотой в физиологически близких концентрациях преимущественно окисляет специфические остатки метионина  $\alpha\text{Met476}$ ,  $\beta\text{Met367}$  и  $\gamma\text{Met78}$ , которые локализованы в  $\alpha\text{C}$ -домене,  $\text{COOH}$ -концах  $\beta\beta$ -цепи и  $\alpha$ -суперспиральном участке  $\gamma$ -цепи, соответственно. Значимость этой работы заключается в том, что впервые было сопоставлено нарушение функциональных свойств окисленного фибриногена, имеющего результатом ингибирование процесса латеральной агрегации фибриновых фибрилл, с конкретным окислительным сайтом,  $\text{Met476}$ , локализованным на  $\alpha\text{C}$ -доменах молекулы фибриногена. Так как латеральная агрегация протофибрилл фибрина опосредуется взаимодействующими между собой  $\alpha\text{C}$ -доменами (Weisel, Litvinov, 2017), было высказано предположение (Weigandt et al., 2012; Martinez et al., 2013; Pederson, Interlandi, 2019), что окислительная модификация  $\text{Met476}$  способна нарушить эти взаимодействия.

Последующие исследования индуцированного окисления фибриногена различными окисляющими агентами также обнаружили ряд остатков метионинов, превращенных в метионинсульфоксид (Юрина и др., 2019, 2020; Yurina et al., 2019; Sovová et al., 2020), принадлежащих всем трем полипептидным цепям белка. Во всех случаях, то есть независимо от вида и дозы окислителя, в списке модифицированных метионинов присутствовали три метионина —  $\alpha\alpha\text{Met476}$ ,  $\beta\beta\text{Met367}$  и

$\gamma\text{Met78}$ . Топография окисленных остатков метионинов в молекуле фибриногена при его индуцированном окислении озоном, гипохлоритом и перекисью водорода представлена на рис. 5.

С помощью масс-спектрометрии были выявлены окислительные модификации метионинов в структуре фибриногена в плазме крови доноров и у пациентов с коагулопатией, возникающей вследствие травмы (White et al., 2016). Метионинсульфоксиды находились в семи различных положениях, но у субъектов, страдающих коагулопатией, они были слегка повышены только в положениях  $\beta\beta\text{Met314}$  и  $\alpha\alpha\text{Met476}$ , по сравнению с контрольной группой (White et al., 2016).

При анализе роли модифицированных окислением метионинов в самосборке фибрина возникает ощущение сложности и некоторой запутанности в возможности достаточно строго обоснованного приписывания им антиоксидантных или функциональных свойств. Например, в выполненных исследованиях (Weigandt et al., 2012; White et al., 2016) декларируется функциональная значимость остатка  $\alpha\alpha\text{Met476}$ , подтверждаемая результатами компьютерного моделирования структуры и динамики взаимодействий  $\alpha\text{C}$ -доменов, которые демонстрируют снижение вероятности образования димеров  $\alpha\text{C}$ -доменов за счет окисления  $\alpha\alpha\text{Met476}$  (Pederson, Interlandi, 2019).

Попытаемся в этом разобраться более подробно. Каждый  $\alpha\text{C}$ -домен состоит из двух независимо свернутых структур — N- и C-концевых субдоменов, образованных остатками  $\alpha\alpha\text{392–503}$  и  $\alpha\alpha\text{504–610}$ , соответственно (Weisel, Litvinov, 2017). Полимеризация  $\alpha\text{C}$ - $\alpha\text{C}$  включает два механизма. Один из них состоит в самоассоциации  $\alpha\text{C}$ -доменов, которая происходит посредством взаимодействующих структур,  $\beta$ -шпилек, принадлежащих N-концевым субдоменам (Tsurupa et al., 2012). Окисление  $\alpha\alpha\text{Met476}$ , как предполагается, опосредует ингибирование боковой агре-



гации протофибрилл фибрина путем нарушения ключевой структуры  $\beta$ -шпильки (Burney et al., 2014).

Второй механизм заключается во взаимодействии С-концевого субдомена с  $\alpha$ С-коннектором (Tsurupa et al., 2012). Из представленного в работах списка модификаций метионинов (Юрина и др., 2019, 2020; Yurina et al., 2019; Sovová et al., 2020), следует, что в  $\alpha$ С-области ( $\alpha$ С-домен, соединенный с  $\alpha$ С-коннектором) имеется целый ряд окисленных метионинов, среди которых могут быть функционально значимые для сборки фибрина, кроме A $\alpha$ Met476. В частности, можно предположить, что модификация метионинов в  $\alpha$ С-коннекторе, Met235, Met238 и Met240, нарушает его структурную гибкость, не позволяющую ему в полной мере обеспечить взаимодействия с С-концевым субдоменом  $\alpha$ С-домена. Кроме того, в самом С-концевом субдоме идентифицированы окислительные модификации метионинов A $\alpha$ Met517 и A $\alpha$ Met584, которые также могли бы обуславливать ингибирование процесса латеральной агрегации. Если к этому добавить, что  $\alpha$ С-области не являются единственно необходимыми для латеральной агрегации (Weisel, Litvinov, 2017), то есть имеются также и другие структуры, ответственные за этот процесс, ситуация с трактовкой роли A $\alpha$ Met517 становится совсем неоднозначной.

И наконец то, что A $\alpha$ Met476 оказывается легко окисляемым не только благодаря индуцированному окислению, но уже содержится в окисленной форме в исходных, то есть необработанных образцах (Юрина и др., 2019, 2020; Yurina et al., 2019), подразумевает, что этот метионин может располагаться на белковой поверхности или близко к ней. Такой метионин, как многократно указывалось в настоящей работе, скорее является антиоксидантным, нежели выполняет важную функциональную роль. Это в полной мере можно отнести и к остаткам B $\beta$ Met367 и  $\gamma$ Met78.

Таким образом, только дальнейшие исследования посттрансляционных модификаций в фибриногене и последующих нарушений в его функциональных свойствах смогут внести полную ясность в эту крайне запутанную проблему (De Vries et al., 2020; Kattula et al., 2020).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной обзорной работе рассмотрены некоторые примеры окисления метионинов во внутриклеточных и плазмменных белках и их возможная роль в поддержании или нарушении функционирования этих белков. Во внутриклеточных белках ферментативное окисление метионинов, способность метионинсульфоксид редуктаз полностью восстанавливать метионинсульфоксиды в

исходную форму, а также наличие антиоксидантных метионинов являются важными механизмами регуляции клеточных функций. Некоторые плазмменные белки могут обладать большим количеством антиоксидантных метионинов, в то время как другие — теряют свою активность при окислении единственного остатка. Физиологический смысл этого феномена пока остается неясным. Большинство наших сегодняшних представлений о конкретных белковых мишенях и функциональных последствиях окисления метионина в белках получены из исследований *in vitro* и очень ограничено *in vivo*. Поэтому многое еще предстоит изучить, чтобы понять эволюционную роль окисления метионинов в белках в поддержании гомеостаза и те причины, которые способствуют развитию патологий. В любом случае, если еще какое-то время назад предполагали, что окисление белков носит случайный характер, сейчас, очевидно, что это не так, и окисление подчиняется определенной программе, смысл которой нам еще до конца не ясен. Важную роль в идентификации модифицированных метионинов сыграло развитие метода масс-спектрометрии высокого разрешения, способного дифференцировать метионины по их окислительной уязвимости в структуре белков, свидетельствующее об их пространственном расположении. Однако новые методы и модели необходимы для более глубокого и всестороннего понимания механизмов, регулирующих специфические реакции окисления метионинов в белках в живом организме.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность анонимному рецензенту за ценные замечания, способствующие улучшению качества публикации.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по научному проекту 18-04-01313.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биол. хим. 2013. Т. 53. С. 245–296.
- Карбышев М.С., Абдуллаев Ш.П. Биохимия оксидативного стресса. Учебно-методическое пособие / Ред. А.В. Шестопалов. М.: Издательство ХХ, 2018. 60 с.
- Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях (пособие для врачей). М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. 78 с.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма “Слово”, 2006. 556 с.
- Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биол. хим. 2013. Т. 53. С. 195–244.
- Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бугрова А.Е. и др. Индуцированная гипохлоритом окислительная модификация фибриногена // ДАН. 2019. Т. 484. С. 367–371.
- Юрина Л.В., Васильева А.Д., Кононенко В.Л. и др. Структурно-функциональные повреждения фибриногена в результате пероксид-индуцированного окисления // ДАН. 2020. Т. 492. С. 287–292.
- Aledo J.C. Methionine in proteins: the Cinderella of the proteinogenic amino acids // Protein Science. 2019. V. 28. P. 1785–1796.
- Aledo J.C., Cantón F.R., Veredas F.J. Sulphur atoms from methionines interacting with aromatic residues are less prone to oxidation // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 16955.
- Aledo J.C., Li Y., de Magalhães J.P. et al. Mitochondrially encoded methionine is inversely related to longevity in mammals // Aging Cell. 2011. V. 10. P. 198–207.
- Aledo J.C., Valverde H., De Magalhães J.P. Mutational bias plays an important role in shaping longevity-related amino acid content in mammalian mtDNA-encoded proteins // J. Mol. Evol. 2012. V. 74. P. 332–341.
- Bagoly Z., Muszbek L. Factor XIII: what does it look like? // J. Thromb. Haemost. 2019. V. 17. P. 714–716.
- Barbato G., Ikura M., Kay L.E. et al. Backbone dynamics of calmodulin studied by 15N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 5269–5278.
- Bender A., Hajieva P., Moosmann B. Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria // PNAS USA. 2008. V. 105. P. 16496–16501.
- Bruschi M., Candiano G., Santucci L., Ghiggeri G.M. Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. P. 5473–5479.
- Burney P.R., White N., Pfaendtner J. Structural effects of methionine oxidation on isolated subdomains of human fibrin D and  $\alpha$ C regions // PLoS One. 2014. V. 9. P. 1–10.
- Carocho M., Ferreira I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives // Food Chem. Toxicol. 2013. V. 51. P. 15–25.
- Carrell N.A., Erickson H.P., McDonagh J. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 551–556.
- Carrell R.W., Stein P.E., Fermi G., Wardell M.R. Biological implications of a 3 Å structure of dimeric antithrombin // Structure. 1994. V. 2. P. 257–270.
- Cater J.H., Wilson M.R., Wyatt A.R. Alpha-2-macroglobulin, a hypochlorite-regulated chaperone and immune system modulator // Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. P. 5410657.
- Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems // PNAS USA. 1997. V. 94. P. 2969–2974.
- Chen B., Mayer M.U., Squier T.C. Structural uncoupling between opposing domains of oxidized calmodulin underlies the enhanced binding affinity and inhibition of the plasma membrane Ca-ATPase // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 4737–4747.
- Chin D., Means A.R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor // Trends Cell. Biol. 2000. V. 10. P. 322–328.
- Chyan C.-L., Irene D., Lin S.-M. The recognition of calmodulin to the target sequence of calcineurin – a novel binding mode // Molecules. 2017. V. 22. P. 1584.
- Cobley J.N. Mechanisms of mitochondrial ROS production in assisted reproduction: the known, the unknown, and the intriguing // Antioxidants (Basel). 2020. V. 9. P. 933.
- Dahl J.U., Gray M.J., Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 1549–1563.
- Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 805–825.
- De Cristofaro R., Landolfi R. Oxidation of human alpha-thrombin by the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-chloride system: structural and functional effects // Thromb. Haemost. 2000. V. 83. P. 253–261.
- De Vries J.J., Snoek C.J.M., Rijken D.C., de Maat M.P.M. Effects of post-translational modifications of fibrinogen on clot formation, clot structure, and fibrinolysis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2020. V. 40. P. 554–569.
- Douglas T., Daniel D.S., Parida B.K. et al. Methionine sulfide reductase A (MsrA) deficiency affects the survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophages // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 3590–3598.
- Drazic A., Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1844. P. 1367–1382.
- Elmallah M.I., Borgmeyer U., Betzel C., Redecke L. Impact of methionine oxidation as an initial event on the path-

- way of human prion protein conversion // *Prion*. 2013. V. 7. P. 404–411.
- Gan Q.F., Witkop G.L., Sloane D.L. et al. Identification of a specific methionine in mammalian 15-lipoxygenase which is oxygenated by the enzyme product 13-HPODE: dissociation of sulfoxide formation from self-inactivation // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 7069–7079.
- Garner B., Waldeck A.R., Witting P.K. et al. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII // *J. Biol. Chem.* 1998. V. P. 6088–6095.
- Gellman S.H. On the role of methionine residues in the sequence independent recognition of nonpolar protein surfaces // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 6633–6636.
- Gifford J.L., Walsh M.P., Vogel H.J. Structures and metal-ion-binding properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding helix-loop-helix EF-hand motifs // *Biochem. J.* 2007. V. 405. P. 199–221.
- Gray E., Barrowcliffe T.W. Inhibition of antithrombin III by lipid peroxides // *Thromb. Res.* 1985. V. 37. P. 241–250.
- Griffiths H.R., Dias I.H., Willetts R.S., Devitt A. Redox regulation of protein damage // *Redox. Biol.* 2014. V. 2. P. 430–435.
- Grintsevich E.E., Ge P., Sawaya M.R. et al. Catastrophic disassembly of actin filaments via Mical-mediated oxidation // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 2183.
- Grintsevich E.E., Yesilyurt H.G., Rich S.K. et al. F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin // *Nat. Cell. Biol.* 2016. V. 18. P. 876–885.
- Grune T., Catalgol B., Jung T. Protein oxidation and aging // *Wiley Online Library*. 2013. P. 524.
- Grune T., Reinheckel T., Davies K.J. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 15504–15509.
- Gu S.X., Stevens J.W., Lentz S.R. Regulation of thrombosis and vascular function by protein methionine oxidation // *Blood*. 2015. V. 125. P. 3851–3859.
- Gutmann C., Siow R., Gwozdz A.M. et al. Reactive oxygen species in venous thrombosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1918.
- Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins // *Amino Acids*. 2003. V. 25. P. 259–274.
- Hsu Y.R., Narhi L.O., Spahr C. *In vitro* methionine oxidation of *Escherichia coli*-derived human stem cell factor: effects on the molecular structure, biological activity, and dimerization // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 1165–1173.
- Hung R.-J., Park C.W., Terman J.R. Direct redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical // *Science*. 2011. V. 334. P. 1710–1714.
- Hung R.-J., Spaeth C.S., Yesilyurt H.G., Terman J.R. SelR reverses Mical-mediated oxidation of actin to regulate F-actin dynamics // *Nat. Cell. Biol.* 2013. V. 15. P. 1445–1454.
- Kattula S., Byrnes J.R., Wolberg A.S. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017. V. 37. P. e13–e21.
- Keck R.G. The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins // *Anal. Biochem.* 1996. V. 236. P. 56–62.
- Khan S.A., Khan F.H. Hydroxyl radical mediates oxidative modification of caprine alpha-2-macroglobulin // *Protein Pept. Lett.* 2009. V. 16. P. 32–35.
- Le-Donne I., Rossi R., Milzani A. et al. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. V. 31. P. 1624–1632.
- Lim J.C., Kim G., Levine R.L. Stereospecific oxidation of calmodulin by methionine sulfoxide reductase A // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 61. P. 257–264.
- Lim J., Kim G., Levine R. Methionine in proteins: it's not just for protein initiation anymore // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. P. 1–11.
- Lim J.C., You Z., Kim G., Levine R.L. Methionine sulfoxide reductase A is a stereospecific methionine oxidase // *PNAS USA*. 2011. V. 108. P. 10472–10477.
- Lishko V.K., Podolnikova N.P., Yakubenko V.P. et al. Multiple binding sites in fibrinogen for integrin  $\alpha\text{Mb}\beta\text{2}$  (Mac-1) // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 44897–44906.
- Liu F., Chu X., Lu H.P., Wang J. Molecular mechanism of multispecific recognition of calmodulin through conformational changes // *PNAS. USA*. 2017. V. 114. P. E3927–E3934.
- Lu A.L., Li X., Gu Y. et al. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions // *Cell. Biochem. Biophys.* 2001. V. 35. P. 141–170.
- Manta B., Gladyshev V.N. Regulated methionine oxidation by monooxygenases // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 109. P. 141–155.
- Marimoutou M., Springer D.A., Liu C. et al. Oxidation of methionine 77 in calmodulin alters mouse growth and behavior // *Antioxidants (Basel)*. 2018. V. 7 (10). P. 140.
- Marrero A., Duquerroy S., Trapani S. et al. The crystal structure of human alpha2-macroglobulin reveals a unique molecular cage // *Angewandte Chemie. (Internat. ed. in English)*. 2012. V. 51. P. 3340–3344.
- Martinez M., Weisel J.W., Ischiropoulos H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 411–418.
- McCarthy M.R., Thompson A.R., Nitu F. et al. Impact of methionine oxidation on calmodulin structural dynamics // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 456. P. 567–572.
- Milzani A., Rossi R., Di Simplicio P. et al. The oxidation produced by hydrogen peroxide on Ca-ATP-G-actin // *Protein Sci.* 2000. V. 9. P. 1774–1782.
- Misztal T., Golaszewska A., Tomasiak-Lozowska M.M. et al. The myeloperoxidase product, hypochlorous acid, reduces thrombus formation under flow and attenuates



- clot retraction and fibrinolysis in human blood // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. V. 141. P. 426–437.
- Moskovitz J., Bar-Noy S., Williams W.M. et al. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals // *PNAS USA*. 2001. V. 98. P. 12920–12925.
- Moskovitz J., Berlett B.S., Poston J.M., Stadtman E.R. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo* // *PNAS USA*. 1997. V. 94. P. 9585–9589.
- Moskovitz J., Flescher E., Berlett B.S. et al. Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress // *PNAS USA*. 1998. V. 95. P. 14071–14075.
- Moskovitz J., Levine R.L., Stadtman E.R. Oxidation of methionine in proteins roles in antioxidant defense and cellular regulation // *IUBMB Life*. 2000. V. 50. P. 301–317.
- Nimalaratne C., Wu J. Hen egg as an antioxidant food commodity: a review // *Nutrients*. V. 2015. V. 7. P. 8274–8293.
- Nishinaka Y., Masutani H., Nakamura H., Yodoi J. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses // *Redox Rep.* 2001. V. 6. P. 289–295.
- Oda T., Iwasa M., Aihara T. et al. The nature of the globular- to fibrous-actin transition // *Nature*. 2009. V. 457. P. 441–445.
- Olson S.T., Björk I. Regulation of thrombin activity by anti-thrombin and heparin // *Sem. Thromb. Hemost.* 1994. V. 20. P. 373–409.
- Olson S.T., Swanson R., Raub-Segall E. et al. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems. Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin // *Thromb. Haemost.* 2004. V. 92. P. 929–939.
- Pederson E.N., Interlandi G. Oxidation-induced destabilization of the fibrinogen  $\alpha$ C-domain dimer investigated by molecular dynamics simulations // *Proteins*. 2019. V. 87. P. 826–836.
- Poljšak B., Fink R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. V. 2014. P. 1–22.
- Protopopova A.D., Ramirez A., Klinov D.V. et al. Factor XIII topology: organization of B subunits and changes with activation studied with single-molecule atomic force microscopy // *J. Thromb. Haemost.* 2019. V. 17. P. 737–748.
- Qin Z., Squier T.C. Calcium-dependent stabilization of the central sequence between Met(76) and Ser(81) in vertebrate calmodulin // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 2908–2918.
- Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A., Church F.C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. (Suppl. 1). P. 102–115.
- Ray P.D., Huang B.-W., Tsuiji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling // *Cell. Signal.* 2012. V. 24. P. 981–990.
- Reddy V.Y., Desorchers P.E., Pizzo S.V. et al. Oxidative dissociation of human  $\alpha$ 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 4683–4691.
- Rehman A.A., Ahsan H., Khan F.H.  $\alpha$ -2-Macroglobulin: a physiological guardian // *J. Cell. Physiol.* 2013. V. 8. P. 1665–1675.
- Rijken D.C., Uitte de Willige S. Inhibition of fibrinolysis by coagulation Factor XIII // *Biomed. Res. Int.* 2017. P. 1209676.
- Rizzo A.M., Berselli P., Zava S. et al. Endogenous antioxidants and radical scavengers // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 698. P. 52–67.
- Rivett A.J. Regulation of intracellular protein turnover: covalent modification as a mechanism of marking proteins for degradation // *Curr. Top. Cell. Reg.* 1986. V. 28. P. 291–337.
- Rosenfeld M.A., Bychkova A.V., Shchegolikhin A.N. et al. Ozone-induced oxidative modification of plasma fibrin-stabilizing factor // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1834. P. 2470–2479.
- Rosenfeld M.A., Vasilyeva A.D., Yurina L.V. et al. Oxidation of proteins: is it a programmed process? // *Free Radic. Res.* 2018. V. 52. P. 14–38.
- Ruan H., Tang X.D., Chen M.L. et al. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase // *PNAS USA*. 2002. V. 99. P. 2748–2753.
- Shacter E., Williams J.A., Lim M. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. P. 429–436.
- Sigalov A.B., Stern L.J. Enzymatic repair of oxidative damage to human apolipoprotein A-I // *FEBS Lett.* 1998. V. 433. P. 196–200.
- Simiczyjew A., Mazur A.J., Dratkiewicz E., Nowak D. Involvement of  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin isoforms in actin cytoskeleton organization and migration abilities of bleb-forming human colon cancer cells // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0173709.
- Souri M., Kaetsu H., Ichinose A. Sushi domains in the subunit-B of factor XIII responsible for oligomer assembly // *Biomolecules*. 2008. V. 47. P. 8656–8664.
- Souri M., Osaki T., Ichinose A. The non-catalytic B subunit of coagulation factor XIII accelerates fibrin cross-linking // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 12027–12039.
- Sovová Ž., Štikarová J., Kaufmanová J. et al. Impact of post-translational modifications on atomistic structure of fibrinogen // *PLoS One*. 2020. V. 15. P. e0227543.
- Spahr C.S., Nahri L., Speakman J. et al. The effects of *in vitro* methionine oxidation on the bioactivity and structure of human keratinocyte growth factor // *Protein Sci.* 1996. V. 5. P. 299–308.
- Stadtman E.R., Levine R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins // *Amino Acids*. 2003. V. 25. P. 207–218.
- Stief T.W., Aab A., Heimbürger N. Oxidative inactivation of purified human  $\alpha$ 2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor // *Thromb. Res.* 1988. V. 49. P. 581–589.

- Stief T. W., Kurz J., Doss M. O., Fareed J. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood // *Thromb. Res.* 2000. V. 97. P. 473–480.
- Stournaras C., Drewes G., Blackholm H. et al. Glutathionyl (cysteine-374) actin forms filaments of low mechanical stability // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. V. 1037. P. 86–91.
- Tarrago L., Kaya A., Weerapana E. et al. Methionine sulfoxide reductases preferentially reduce unfolded oxidized proteins and protect cells from oxidative protein unfolding // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 24448–24459.
- Tebar F., Chavero A., Agell N. et al. Pleiotropic roles of calmodulin in the regulation of KRas and Rac1 GTPases: functional diversity in health and disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3680.
- Tse G., Yan B. P., Chan Y. W. et al. Reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction: the link with cardiac arrhythmogenesis // *Front. Physiol.* 2016. V. 7. P. 313.
- Tsurupa G., Pechik I., Litvinov R. I. et al. On the mechanism of alphaC polymer formation in fibrin // *Biochemistry.* 2012. V. 51. P. 2526–2538.
- van Patten S. M., Hanson E., Bernasconi R. et al. Oxidation of methionine residues in antithrombin. Effects on biological activity and heparin binding // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 10268–10276.
- Vasilyeva A., Indeykina M., Bychkova A. et al. Oxidation-induced modifications of the catalytic subunits of plasma fibrin-stabilizing factor at the different stages of its activation identified by mass spectrometry // *Biochim. Biophys. Acta.* 2018. V. 1866. P. 875–884.
- Vasilyeva A., Yurina L., Shchegolikhin A. et al. The structure of blood coagulation factor XIII is adapted to oxidation // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 914.
- Veredas F. J., Aledo J. C., Cantón F. R. Methionine residues around phosphorylation sites are preferentially oxidized *in vivo* under stress conditions // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40403.
- Vetter S. W., Leclerc E. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 404–414.
- Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal // *Free Radic. Biol. Med.* 1995. V. 18. P. 93–105.
- Walgenbach D. G., Gregory A. J., Klein J. C. Unique methionine-aromatic interactions govern the calmodulin redox sensor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 20. P. 236–241.
- Walker E. J., Bettinger J. Q., Welle K. A. et al. Global analysis of methionine oxidation provides a census of folding stabilities for the human proteome // *PNAS USA.* 2019. V. 116. P. 6081–6090.
- Wang J., Boja E. S., Tan W. et al. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 47763–47766.
- Wang P., Wu Y., Li X. et al. Thioredoxin and thioredoxin reductase control tissue factor activity by thiol redox-dependent mechanism // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 3346–3358.
- Wang Q., Zennadi R. Oxidative stress and thrombosis during aging: the roles of oxidative stress in RBCs in venous thrombosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 4259.
- Wang Z., Feng B., Xiao G., Zhou Z. Roles of methionine oxidation in E200K prion protein misfolding: implications for the mechanism of pathogenesis in E200K linked familial Creutzfeldt-Jakob disease // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1864. P. 346–358.
- Weigandt K. M., White N., Chung D. et al. Fibrin clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen // *Biophys. J.* 2012. V. 103. P. 2399–2407.
- Weisel J. W., Litvinov R. I. Fibrin formation, structure and properties // *Subcell. Biochem.* 2017. V. 82. P. 405–456.
- Weissbach H., Resnick I., Brot N. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1703. P. 203–212.
- White N. J., Wang Y., Fu X. et al. Post-translational oxidative modification of fibrinogen is associated with coagulopathy after traumatic injury // *Free Radic. Biol. Med.* 2016. V. 96. P. 181–189.
- Wilson C., Terman J. R., González-Billault C., Ahmed G. Actin filaments-A target for redox regulation // *Cytoskeleton.* 2016. V. 73. P. 577–595.
- Wu S. M., Patel D. D., Pizzo S. V. Oxidized alpha2-macroglobulin (alpha2M) differentially regulates receptor binding by cytokines/growth factors: implications for tissue injury and repair mechanisms in inflammation // *J. Immunol.* 1998. V. 161. P. 4356–4365.
- Wyatt A. R., Kumita J. R., Farrarwell N. E. et al. Alpha-2-macroglobulin is acutely sensitive to freezing and lyophilization: implications for structural and functional studies // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0130036.
- Wyatt A. R., Kumita J. R., Mifsud R. W. et al. Hypochlorite-induced structural modifications enhance the chaperone activity of human  $\alpha_2$ -macroglobulin // *PNAS USA.* 2014. V. 111. P. 2081–2090.
- Xu K., Uversky V. N., Xue B. Local flexibility facilitates oxidation of buried methionine residues // *Protein Pept. Lett.* 2012. V. 19. P. 688–697.
- Xu Q., Huff L. P., Fujii M., Griendling K. K. Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 109. P. 84–107.
- Yamniuk A. P., Vogel H. J. Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides // *Mol. Biotechnol.* 2004. V. 27. P. 33–57.
- Yermolaieva O., Xu R., Schinstock C. et al. Methionine sulfoxide reductase A protects neuronal cells against brief hypoxia/reoxygenation // *PNAS USA.* 2004. V. 101. P. 1159–1164.
- Yurina L., Vasilyeva A., Indeykina M. et al. Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry // *Free Radic. Res.* 2019. V. 53. P. 430–455.

## The Functional Role of Methionine Oxidation in Proteins: Arguments “for” and “against”

M. A. Rosenfeld<sup>a,\*</sup>, L. V. Yurina<sup>a</sup>, and A. D. Vasilyeva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*\*e-mail: rosenfeld41@mail.ru*

The conversion of methionine to methionine sulfoxide (MetO) is one of the most common oxidative modifications in proteins due to particular susceptibility of methionines to oxidative conditions. Methionine oxidation can affect a protein structure and function, and MetO levels increase with the development of oxidative stress. Most cells contain methionine sulfoxide reductases (MSR) which catalyze the thioredoxin-dependent reductions of methionine sulfoxides back to the reduced form. It has been shown that mutations leading to a decrease in MSR activities are associated with a decrease in the resistance of some cells to oxidative stress, while mutations leading to an overproduction of MSR activities lead to an increase in resistance to oxidative stress. The redox reactions of methionines in the functional regulation of some intracellular proteins, actin and calmodulin, as well as the presence of antioxidant methionines in intracellular proteins such as glutamine synthetase, 15-lipoxygenase, interferon  $\alpha$ -2b, tissue plasminogen activator, human stem cell factor are described. Since there are no methionine sulfoxide reductases in blood plasma, oxidation of methionines is irreversible. Methionines which are able to trap different ROS species without disrupting the function of proteins have been found in  $\alpha_2$ -macroglobulin, antithrombin III, coagulation factor XIII. Nevertheless, antioxidant methionines in other plasma proteins still remain to be identified. Given the important role of methionines in the structure and functioning of plasma proteins, the contribution of methionines to both oxidative damage of proteins and oxidation-associated pathologies is analyzed.

**Keywords:** antioxidant and regulatory methionines, methionine sulfoxide reductase, reversible oxidation, intra- and extracellular proteins

УДК 543.5;547.96;577

## РОЛЬ АЛЬБУМИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ В ПРОВЕДЕНИИ РЕГУЛЯТОРНОГО СИГНАЛА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2021 г. М. С. Краснов<sup>1</sup>, \*, А. П. Ильина<sup>2</sup>, В. П. Ямскова<sup>2</sup>, \*\*

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт проблем биорегуляции, Москва, Россия

\*e-mail: embrmsk@mail.ru

\*\*e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2021 г.

После доработки 11.01.2021 г.

Принята к публикации 11.01.2021 г.

Представлен обзор данных по исследованию структуры, физико-химических свойств и биологической активности белково-пептидных комплексов (БПК), локализованных внеклеточно, участвующих в межклеточной адгезии и активирующих клеточные источники регенерации в тканях позвоночных. БПК состоят из определенных изоформ сывороточного альбумина и пептидов – продуктов протеолиза известных мембранных и адгезивных белков. Биологическое действие БПК характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности, а также дозовой зависимостью. В растворах БПК находятся в виде наноразмерных частиц, это состояние связано с проявлением биологической активности. Рассматривается возможный механизм строения БПК и его взаимодействия с плазматической мембраной клетки.

**Ключевые слова:** альбумины, сыворотка крови, биорегуляторы

**DOI:** 10.31857/S0042132421040049

### ВВЕДЕНИЕ

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) были обнаружены в различных тканях позвоночных (млекопитающих, птиц, амфибий, рыб) и беспозвоночных животных (Ямскова, Резникова, 1979; Ямскова и др., 2012). Эти биологически активные вещества были выделены в отдельную группу на основании общности проявляемых физико-химических свойств и характера биологического действия. Было установлено, МГТБ локализованы в межклеточном пространстве тканей. Они влияют на основные биологические процессы (адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток), стимулируют восстановление и регенерацию в патологически измененных тканях. Активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности (Ямскова и др., 2012). Исследование МГТБ оказалось возможным благодаря разработке нового экспериментального подхода, сочетающего в себе методы выделения, очистки, изучения физико-химических свойств, а также метод биотестирования биорегуляторов этой группы и изучения специфической биологической активности (Ямскова, Резникова, 1991).

Выделение биорегуляторов данной группы из тканей осуществляется путем экстракции небольших фрагментов свежеполученной ткани животных при низкой температуре в физиологическом растворе. При этом исключается гомогенизация ткани, ферментативная обработка и другие воздействия, вызывающие нарушение целостности клеток. Было высказано предположение, что основным фактором, определяющим переход биорегуляторов данной группы во внешнюю среду, является температура экстрагирующего раствора – 4°C. При этой температуре происходит фазовый переход бислоя плазматической мембраны (ПМ), в результате которого связанная с ним (например, через мембранные якоря) надмолекулярная белковая структура может “соскочить” с ПМ и перейти во внешнюю среду (Ямскова, Резникова, 1979). Присутствие ионов кальция в экстрагирующем растворе не оказывает влияния на процесс выделения МГТБ (Ямскова и др., 1990).

МГТБ млекопитающих имеют сложный состав. Их основу составляют белково-пептидные комплексы (БПК), содержащие биологически активные пептиды с мол. массой от 1000 до 6000 Да и белок-модулятор, который модулирует их активность, причем в различных тканях это может при-

**Таблица 1.** Перечень сигналов масс-спектров пептидов, идентифицированных в супернатантах тканевых экстрактов быка и крысы (Ильина и др., 2011)

| Ткань, из которой выделен пептид   | M(m/z)                                                            |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Склера глаза быка                  | 4171, 4302, 4531, 4819                                            |
| Роговица глаза быка                | 1442, 3376, 3973, 4302, 4418, 4531, 4817, 8604                    |
| Хрусталик глаза быка               | 4302, 4529, 4817, 8604                                            |
| Радужка глаза быка                 | 3944, 4301                                                        |
| Цилиарное тело глаза быка          | 4301                                                              |
| Стекловидное тело глаза быка       | 4300, 4370, 4420                                                  |
| Сетчатка глаза быка                | 4302, 4528, 4819, 8603                                            |
| Пигментный эпителий глаза быка     | 4303, 4372, 4532, 4819                                            |
| Сыворотка крови быка               | 1151, 1448, 1666, 1812, 1915, 2016                                |
| Эмбриональная сыворотка крови быка | 4301, 8601                                                        |
| Печень быка                        | 2112, 2170, 2866, 2940, 3009, 3151, 5026, 5237                    |
| Печень крысы                       | 3649, 5025                                                        |
| Мозг крысы                         | 2820, 3481, 4300, 4331, 4403, 4671, 4749, 4801, 9945              |
| Сердце крысы                       | 3049, 3262, 7565, 7684, 8463, 8581, 8766, 8967, 9094, 9951, 10404 |
| Кость крысы                        | 4301                                                              |

водить как к ее ингибированию, так и к ее увеличению или даже нивелированию (Ямскова, Резникова, 1991; Ямскова и др., 2004, 2009б, 2012). Ионы кальция участвуют в поддержании структуры, активности МГТБ и в образовании БПК (Ямскова, 1978; Краснов и др., 2003а; Ямсков и др., 2009). Результаты масс-спектрометрического исследования пептидов, входящих в состав МГТБ, показывают, что для ткани соответствующего органа определенного вида животного существует постоянный набор пептидов (табл. 1) (Ямскова и др., 2004, 2009б; Ильина и др., 2011).

Для некоторых МГТБ удалось идентифицировать первичную структуру пептидов. Прибегнув к методам протеомного анализа, было установлено, например, что полипептид с молекулярной массой  $4749 \pm 2$  Да, отвечающий за проявление биологической активности МГТБ, выделенного из головного мозга крысы, является N-концевым участком гуанин-нуклеотидсвязывающего G<sub>0</sub>-белка мозга крысы (Ильина и др., 2014); пептид с молекулярной массой  $4372 \pm 2$  Да, выделенный из пигментного эпителия глаза крупного рогатого скота (КРС), структурно идентичен N-концевому фрагменту фосфодиэстеразы циклического ГМФ (КФ 3.1.4.17) сетчатки КРС (Ильина и др., 2011); в результате леддерного секвенирования карбокси-пептидазой Y были идентифицированы C-концевые последовательности двух пептидов, входящих в состав МГТБ, выделенного из сыворотки крови, — аминокислотная последовательность пептида с молекулярной массой  $1448 \pm 2$  Да гомологична N-концевому фрагменту Р-кадгерина эндотелия бычьей аорты; C-концевая аминокис-

лотная последовательность пептида с молекулярной массой  $1151 \pm 2$  Да структурно сходна с N-концевой последовательностью фрагмента киназного домена регуляторного белка TRB-2 гранулоцитов КРС (Ильина и др., 2019). Таким образом, результаты исследований показали, что пептиды МГТБ являются продуктами протеолиза различных белков поверхности клетки, плазматической мембраны — ферментов, молекул адгезии, G<sub>0</sub>-белков.

Исследуя белки-модуляторы МГТБ, выделенных из различных тканей КРС (сыворотка крови, склера, пигментный эпителий (ПЭ), роговица, передняя камера глаза, зрительный нерв, стекло-видное тело, цилиарное тело, пещеристое тело, яичники, семенники и др.), а также крысы (сыворотка крови, мозг, печень и легкое), было установлено, что они имеют молекулярную массу около 66 кДа (Ямскова и др., 2004; 2009б). Идентификация частичной N-концевой аминокислотной последовательности этих белков показала наличие 100%-ной гомологии с сывороточными альбуминами (СА) быка и крысы, соответственно (Ильина и др., 2019).

Таким образом, полученные результаты предполагают, что МГТБ по сути представляют собой ранее обнаруженные (Peters, 1996), но мало изученные “тканевые формы” альбуминов, которые образовались в результате проникновения СА через гистогематические барьеры организма в межклеточные пространства тканей и взаимодействия по кальций-зависимому механизму с определенными пептидами. Образовавшиеся БПК представляют основу биорегуляторов данной группы. Они характеризуются локализацией в

межклеточном пространстве тканей, оригинальным строением и проявлением уникальных физико-химических свойств, а также выполнением важнейшей функции — участием в проведении и передаче информационного сигнала в организме на органно-тканевом уровне (Ямскова, Ямсков, 1999; Ямскова и др., 2012). Возможно, именно такое взаимодействие лежит в основе “самосборки” МГТБ в межклеточном пространстве. В пользу этого предположения свидетельствует уникальная способность молекулы СА связывать обширный круг лигандов, осуществляя транспорт огромного количества различных веществ в организме. В основе такой важнейшей функции альбумина лежит структурная подвижность его молекулы (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al., 2013).

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛЬБУМИНА

Подробное описание структуры СА, распределение в организме, его свойства и функции подробно описаны в книге (Peters, 1996). В настоящем обзоре мы отметим наиболее важные характеристики структуры СА. Он представляет собой хорошо растворимый стабильный глобулярный белок, который принадлежит к мультисемейству, включающему в себя также  $\alpha$ -фетопротеин, группоспецифический компонент, витамин D-связывающий белок. СА синтезируется и секретируется в печени (Peters, 1996). Он импортируется в эндоплазматический ретикулум, где происходит отщепление его N-концевого препропептида с помощью сериновой протеиназы, после чего белок транспортируется в аппарат Гольджи, а далее возможны его посттрансляционные модификации. Например, в настоящее время обнаружено, более 60 структурных изоформ СА, среди которых существуют также N-гликозилированные варианты. Вторичная структура альбумина характеризуется преобладанием  $\alpha$ -спиралей — около 50–67%. Между остатками цистеина образуется 17 дисульфидных связей, формирующих 9 петель. Каждые три петли организуют глобулярную структуру, центральная часть которой сформирована гидрофобными остатками аминокислот, а внешняя — гидрофильными. Такая структурная единица альбумина называется доменом. СА у разных видов животных и человека характеризуются высокой степенью гомологии: они могут отличаться лишь числом доменов и некоторыми аминокислотными остатками. Молекула СА млекопитающих состоит из трех доменов, каждый из которых содержит 10  $\alpha$ -спиралей и подразделяется на 2 субдомена. Методами кристаллографии было установлено, что полипептидная цепь альбумина образует ассиметричную глобулу в форме сердца с размерами приблизительно  $80 \times 80 \times 30$  Å. Несмотря на большое количество дисульфидных связей, моле-

кула альбумина демонстрирует значительную гибкость, ее петли могут смещаться друг относительно друга. Это позволяет ей совершать обратимые конформационные перестройки при различных воздействиях (Peters, 1996).

СА проявляют антиоксидантные свойства, которые очень важны для поддержания осмотического давления плазмы и внутритканевого движения жидкости. Они осуществляют питательную функцию, являются резервом аминокислот для синтеза белков. Тем не менее, их важнейшей функцией в организме является обратимое связывание и транспорт различных низкомолекулярных эндогенных и экзогенных веществ, причем как гидрофильных, так и гидрофобных — аминокислот, метаболитов, гормонов, холестерина, жирных кислот, билирубина, солей желчных кислот, солей тяжелых металлов, лекарственных препаратов, красителей и многих других (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al., 2013).

При связывании лигандов в молекуле альбумина происходят конформационные перестройки. Они могут быть довольно значительными, например, увеличение или уменьшение количества  $\alpha$ -спиралей. Эти перестройки так же, как и способность молекулы колебаться между изомерными формами в водном растворе, вероятно, обуславливают появление новых мест связывания лигандов различной природы. Также при воздействии ряда физико-химических факторов, таких как температура, изменение pH и ионной силы раствора, присутствие лигандов, присоединение разных химических групп, возможно изменение первичной, вторичной и третичной структуры альбумина (Peters, 1996).

Гибкость молекулы СА и ее чрезвычайная конформационная лабильность создают предпосылки для аллостерических влияний со стороны разнообразных соединений на связывание лигандов с белком. К тому же эти аллостерические взаимодействия вовлечены в формирование новых центров связывания лигандов. Кроме того, на связывание тех или иных лигандов с молекулой СА оказывает влияние наличие единичных или нескольких мутаций в самой молекуле альбумина. Этот факт был установлен при исследовании генетически детерминированного полиморфизма альбумина человека (Peters, 1996; Kragh-Hansen et al., 2013).

Установление первичной структуры молекулы альбумина позволило получить точную информацию о локализации некоторых связывающих участков и выявить тонкие структурные механизмы их взаимодействия с различными веществами. В результате взаимодействия с разнообразными лигандами молекула альбумина претерпевает изменения, которые зависят от химических свойств связываемых веществ и характера образующих

**Таблица 2.** Структурные группы альбуминов, входящих в состав МГТБ, выделенных из различных тканей *Bos taurus*

| Источник альбумина                                                                            | Номер белка в базе данных | Положение аминокислоты в полипептидной цепи альбумина                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Сыворотка крови, стекловидное тело, склера, цилиарное тело, радужка, пещеристое тело, яичники | gi 1351907                | Glu116<br>Ala 214<br>Ala 429<br>Asp 579                              |
| ПЭ, роговица, зрительный нерв                                                                 | gi 36746020               | Glu116<br><b>Thr 214</b><br>Ala 429<br>Asp 579                       |
| Передняя камера глаза                                                                         | gi 74267962               | <b>Ala 116</b><br><b>Thr 214</b><br><b>Glu 429</b><br><b>Gly 579</b> |

Примечание: жирным шрифтом показаны положения в цепи альбумина *Bos taurus*, в которых аминокислоты отличаются от gi|1351907 в разных тканях.

связей. При этом происходят изменения физико-химических свойств как белка, так и самих лигандов, следствием чего может быть или ослабление, или же усиление действия лекарственных веществ в организме или же проявление биологической активности у белка и лигандов после их взаимодействия (Kragh-Hansen et al., 2013). На наш взгляд, обнаруженные в различных тканях животных МГТБ можно привести в качестве примера возникновения специфической активности у БПК, которые образовались в результате взаимодействия СА и лигандов, которые в данном случае представлены пептидами — продуктами протеолиза адгезивных и мембранных белков, функционирующих в соответствующих тканях (Ильина и др., 2011; 2019). В связи с этим было предпринято детальное изучение свойств альбуминов, содержащихся в БПК биорегуляторов группы МГТБ, выделенных из тканей быка и крысы.

## ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА МГТБ И СТРУКТУРЫ ИХ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ

С помощью метода PMF (peptide mass fingerprinting) было установлено, что альбумины входящие в состав МГТБ, выделенных из ряда тканей быка, соответствуют трем изоформам СА *Bos taurus* по базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Данные альбумины отличаются друг от друга составом аминокислот только в четырех положениях полипептидной цепи — 116, 214, 429 и 579 (табл. 2). Аналогичным способом был проведен сравнительный анализ триптических фрагментов альбуминов, выделенных из различных тканей крысы Wistar. Было установлено, что данные альбумины отличаются друг от друга тремя заменами аминокислот полипептид-

ной цепи, соответственно, в положениях 262, 317 и 431 (табл. 3). Установленные замены аминокислот в первичной последовательности СА, входящих в состав МГТБ, выделенных из тканей КРС и крысы расположены во втором и третьем домене его молекулы. Такая корреляция замены аминокислот в первичной последовательности альбуминов может объяснить их способность, как белков-модуляторов, различным образом изменять активность полипептидов МГТБ. Например, в сыворотке крови взаимодействие с белком-модулятором (СА) обратимо ингибирует биологическую активность регуляторных пептидов, а в тканях заднего отдела глаза (пигментный эпителий, радужка, стекловидное тело, цилиарное тело) белки-модуляторы усиливают биологическое действие полипептидов МГТБ (Ямскова и др., 2012).

В состав МГТБ, полученных из ткани каждого отдельного органа млекопитающих, входит определенный набор пептидов, характеризующихся постоянством их количества, а также значений молекулярных масс (табл. 1) (Ильина и др., 2011). Было показано высокое сродство пептидов, именно к “своей” изоформе СА — альбумин “не отдает свои пептиды” даже в условиях длительной обработки БПК смесью дезагрегирующих, хаотропных агентов, органических растворителей (Сидорский и др., 2018). Более того, взаимодействие с пептидами стабилизирует конформацию альбумина в таком БПК, при нарушении этого взаимодействия белок необратимо денатурирует. Важно, что интервакулярный СА — коммерческий препарат из сыворотки крови, не образовывал с пептидами биологически активные БПК (Yamskova et al., 2007).

Подробное исследование вторичной и третичной структур БПК было проведено на примере



**Таблица 3.** Структурные группы альбуминов, входящих в состав МГТБ, выделенных из различных тканей крысы Wistar

| Источник альбумина    | Номер белка в базе данных | Положение аминокислоты в полипептидной цепи альбумина |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------|
| Сыворотка крови, мозг | gi 124028612              | Val 262<br>Ile 317<br>Val 431                         |
| Легкое                | gi 158138568              | <b>Leu 262</b><br><b>Thr 317</b><br><b>Ile 431</b>    |
| Печень                | gi 55628                  | Val 262<br><b>Thr 317</b><br>Val 431                  |

Примечание: жирным шрифтом показаны положения в цепи альбумина крысы Wistar, в которых аминокислоты отличаются от gi|124028612 в разных тканях.

МГТБ из склеры глаза быка (Сидорский и др., 2018; Pyina et al., 2020). Как и все другие биорегуляторы данной группы, выделенные из тканей млекопитающих, МГТБ из склеры глаза представляет собой БПК, состоящий из изоформы СА gi|1351907 и набора определенных пептидов (Ильина и др., 2011, 2019). С помощью методов УФ-, КД-спектроскопии и динамического светорассеяния было изучено влияние температуры и хаотропных агентов на пространственную организацию БПК, входящего в состав данного МГТБ и представляющего его основу. Было установлено, что БПК обладает высокой конформационной термостабильностью. Определена точка конформационного термоперехода, после которой БПК переходит в устойчивое денатурированное состояние.

В водных растворах МГТБ, выделенные из разных тканей животных, образуют термостабильные наноразмерные частицы и проявляют свойства шаперона – ингибитора агрегации модельных белков, индуцируемой дитиотреитолом (ДТТ). На примере МГТБ из склеры шаперонная активность была достаточно подробно изучена (Сидорский и др., 2018; Pyina et al., 2020). Пространственная структура БПК этого биорегулятора характеризуется наличием  $\alpha$ -спирализованной вторичной структуры с точкой конформационного термоперехода в 65°C, что свидетельствует о его значительной стабильности. Установлено, что в водных растворах он образует термостабильные и устойчивые к воздействию хаотропных агентов наноразмерные частицы (приблизительно 100 нм). В то же время пептиды, входящие в состав БПК, стабилизируют молекулу СА, сохраняя его способность к формированию лабильных/подвижных агрегатов (ассоциатов). Данное свойство характерно для молекулярных шаперонов, так как лабильность их олигомеров важна для распознавания и связывания субстратов.

БПК, выделенный из склеры, проявляет свойства шаперона – ингибитора ДТТ-индуцированной агрегации БСА (бычий СА) и лизоцима. Следует отметить, что 100%-ное ингибирование агрегации БСА достигается в 10 раз меньшим количеством БПК, чем ингибирование агрегации лизоцима (Сидорский и др., 2018). Возможно, что стабилизация трехмерной структуры БСА достигается быстрее за счет ее сродства со структурой МГТБ, которое обусловлено взаимодействием их гидрофобных участков. Поскольку механизм действия молекулярных шаперонов основан на их взаимодействии с гидрофобными участками ненативных белков, которое препятствует агрегации этих белков между собой, сохраняя их фолдинг-компетентное состояние, можно предположить, что в физиологических условиях субстрат-связывающие участки альбумина, входящего в состав МГТБ, “спрятаны” внутри мультимера, а повышение температуры вызывает изменение конформации его молекулы, увеличивая доступность гидрофобных участков шаперона и облегчая его связывание с субстратом. Таким образом, МГТБ ингибирует субъединичный обмен между олигомерами агрегирующего белка, проявляя шапероноподобные свойства. На наш взгляд, это важно, поскольку БПК, входящие в состав МГТБ, локализованные внеклеточно, осуществляют контроль за восстановлением правильной нативной третичной или четвертичной структуры белков, а также за образованием и диссоциацией белковых комплексов (Wyatt et al., 2013).

Таким образом, БПК являются основой структуры МГТБ; нам представляется весьма вероятным, что именно с образования БПК начинается “сборка” наноразмерных частиц МГТБ в межклеточном пространстве тканей.

Исследование состава МГТБ показало, что кроме БПК они содержат липиды и углеводы

(Ямсков и др., 2009). После экстракции органическими растворителями фракций МГТБ методом газожидкостной хроматографии были обнаружены остатки таких жирных кислот, как декановая, линолевая, холевая, дезоксихолевая и пальмитиновая. Данные жирные кислоты являются постоянными компонентами многих тканей, в том числе, крови позвоночных животных. Тем не менее, не выясненным остается вопрос: какова их роль в образовании БПК биорегуляторов данной группы, а также в поддержании устойчивых наноразмерных частиц, которые обнаруживаются в растворах МГТБ и от образования которых зависит активность МГТБ (Ямсков и др., 2009). Следует отметить, что в литературе существуют данные, указывающие на значительную роль ненасыщенных жирных кислот в таких важных биологических процессах, как генная экспрессия, клеточная миграция, пролиферация, адгезия и дифференцировка (Lapillonne et al., 2004).

Согласно современным представлениям, большинство лигандов взаимодействуют со своими рецепторами, находящимися на ПМ, по механизму “белок–углеводного узнавания” (Reichardt, 1993). Предполагая, что во взаимодействии с ПМ клетки участвует углеводная детерминанта МГТБ, был изучен ряд различающихся по структуре маннозосодержащих олигосахаридов с помощью адгезиометрического метода, применяемого для биотестирования биорегуляторов данной группы. В этом исследовании была предпринята попытка выявить углеводную компоненту, структура которой наиболее близка по строению к олигоманнозидным цепям МГТБ.

Было показано, что биологически активными являлись структуры  $\text{CH}_3\text{-}\alpha\text{Man}$ ,  $\text{CH}_3\text{-}\alpha\text{Gal}$ , но не  $\text{CH}_3\text{-}\alpha\text{Glu}$ . Из маннозосодержащих олигосахаридов биологическую активность проявляли те, терминальные остатки которых были представлены дисахаридом  $\text{Man}\alpha 1\text{-}2\text{Man}$  и дисахаридом  $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ . Мембранотропная активность этих веществ характеризуется полимодальной дозовой зависимостью, которая сходна с дозовой зависимостью мембранотропной активности МГТБ (Ямскава и др., 2012). Полученные данные указывают на присутствие на поверхности ПМ гепатоцитов сайтов, специфически узнающих маннозо- и галактозосодержащие дисахариды с данными структурами.

Результаты этого исследования согласуются с ранее полученными данными, которые показали, что остатки маннозы, галактозы и N-ацетилглюкозамина играют принципиальную роль в адгезии гепатоцитов *in vitro* (Weigel et al., 1978; Weigel, 1980; Sathyaamoorthy et al., 1991). Полученные данные указывают также на присутствие на поверхности ПМ гепатоцитов сайта, узнающего терминальную структуру  $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$ . Из этих дан-

ных следует, что на поверхности клеток печени присутствуют вещества, содержащие такую олигосахаридную структуру. Это могут быть экспрессируемые гепатоцитами млекопитающих гликопротеины плазмы крови, а также мембраносвязанные гликопротеины печени, в состав которых входят смешанные цепи, содержащие  $\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}$  и  $\text{GalNAc}$  (Sharon, Lis, 1989).

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ МГТБ

Важным этапом в разработке экспериментального подхода к исследованию МГТБ явилось установление локализации данных биорегуляторов в тканях позвоночных животных. Проводили это исследование с помощью методов иммуногистохимии, поликлональные антисыворотки получали по методу Гослинга (Immunoassays ..., 2000). Однако получить поликлональные сыворотки у кроликов удалось только в результате многократной иммунизации небольшими объемами концентрированных растворов высокоочищенных фракций МГТБ. Локализацию МГТБ изучали в тканях крысы и тритона, используя иммуногистохимическую реакцию с использованием вторичных FITC-конъюгированных антител (Краснов и др., 2003а).

Было установлено, что МГТБ локализованы в межклеточном пространстве тканей, которые являлись источником их выделения, причем важно, что идентичная локализация была продемонстрирована как для млекопитающих, так и для амфибий. Полученные результаты указывают на тканеспецифический характер распределения биорегуляторов данной группы, несмотря на очевидные различия в первичной структуре белков животных разных классов, в том числе альбуминов сыворотки крови. Например, флуоресценция вторичных FITC-конъюгированных антител при исследовании локализации МГТБ, выделенного из роговицы глаза быка, была обнаружена в межклеточном пространстве эпителия и эндотелия как в роговице глаза тритона, так и глаза крысы. В этом же исследовании было показано, что в роговицах глаз этих видов позвоночных после культивирования в течение 4 сут наблюдалось значительное увеличение интенсивности специфической иммунофлуоресценции в межклеточном пространстве эпителия и эндотелия, по сравнению с интактной роговицей. Причем усиление интенсивности иммунофлуоресценции в межклеточном пространстве эпителия существенно превосходило таковое в межклеточном пространстве эндотелия. Эти данные предполагают увеличение содержания МГТБ в межклеточном пространстве эпителия роговицы после культивирования, которое может быть связано с активацией защитного механизма, направленного на поддержание целостности и сохранения функции имен-

но эпителии как покровной ткани. Аналогичные наблюдения были сделаны при изучении локализации МГТБ, выделенного из сетчатки глаза быка. В этом случае специфическая флуоресценция была обнаружена на поверхности отростков фоторецепторов сетчатки тритона и крысы (Краснов и др., 2003а).

Иммуногистохимическими методами было показано, что биорегулятор, выделенный из коровьего молока, имел пристеночную локализацию, а также обнаруживался во внутреннем просвете протока лактирующей молочной железы крысы (Назарова и др., 2006). Пристеночную локализацию в протоках предстательной железы мыши демонстрировал биорегулятор, выделенный из предстательной железы быка (Nazarova et al., 2007).

Таким образом, полученные результаты показывают, что не только активность, но и локализация МГТБ характеризуется наличием тканевой, но не видовой специфичности. Представляется правомочным такое объяснение этих данных. На гистологических срезах тканей, окрашенных FITC-мечеными вторичными антителами к IgG кролика, которые взаимодействовали с поликлональной антисывороткой кролика к МГТБ, выделенному из ткани быка, показана внеклеточная локализация комплекса антиген–антитело на протяжении всей поверхности клеток. Это свидетельствует об идентичности определенных эпитопов молекул биорегулятора у животных разных видов, поэтому антитела, полученные на МГТБ, выделенных из определенной ткани быка, могут связываться с соответствующими антигенами (биорегуляторами) в той же ткани другого вида животного, например, у тритона или мыши. Из литературы известно, что гомология между СА человека и быка составляет 76%, а человека и крысы – 73%.

### БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ МГТБ

В экспериментальных сериях, проведенных в условиях *in vivo*, удалось продемонстрировать специфическую активность МГТБ, выделенных из различных тканей млекопитающих (Казанский и др., 2000; Ямскова и др., 2009а; Константиновский и др., 2012; Ямскова и др., 2012; Borisenko et al., 2007). Основные исследования, выполненные в этих работах, были проведены на экспериментальных моделях ряда патологий, которые инициировали локальным нанесением травмы (например, хрящевой ткани коленного сустава или роговицы глаза). В отдельных работах применяли специфические токсины, повреждающие соответствующий орган-мишень, например, стрептозотцин, используемый в экспериментальной модели диабета 2-го типа. Было показано, что МГТБ проявляют выраженное

протекторное действие, которое выражается в поддержании в тканях-мишенях адгезионных межклеточных взаимодействий, работы основных ферментных систем, в увеличении жизнеспособности клеток, а также в стимуляции процессов регенерации (Ямскова и др., 2012).

Тем не менее, для понимания механизма действия МГТБ продолжала оставаться актуальной разработка экспериментальных моделей *in vitro*. В этом аспекте наше внимание привлекли органотипические культуры ткани, в которых сохранена структура межклеточного пространства. Одной из таких моделей явилась культура заднего отдела глаза позвоночных животных с сохранением адгезионных взаимодействий между сетчаткой, пигментным эпителием, хороидом и склерой, разработанная для изучения МГТБ, выделенных из тканей сетчатки и пигментного эпителия глаза (Краснов и др., 2003б). Добавление в среду культивирования МГТБ, выделенного из сетчатки глаза быка, способствовало сохранению пространственной организации этой ткани и ее адгезии с пигментным эпителием в интерфоторецепторном матриксе, а также увеличению жизнеспособности нейронов. При воздействии МГТБ, выделенного из пигментного эпителия глаза быка, наблюдали стабилизацию адгезии и дифференцировки пигментных клеток. Данный биорегулятор оказывал протекторное действие, выражающееся в достоверном увеличении жизнеспособности биполяров нейральной сетчатки *in vitro* (Краснов и др., 2003а). В данном исследовании было установлено, что биорегуляторы, выделенные из тканей, имеющих общее происхождение, которые в онтогенезе связаны метаболически и контактируют между собой, оказывают влияние на жизнеспособность, адгезионные свойства клеток различных типов этих тканей, то есть их активность характеризуется наличием тканевой специфичности, что и нашло подтверждение в результатах исследования первичной структуры полипептидных последовательностей этих биорегуляторов (Ильина и др., 2011, 2019).

Наиболее значимые результаты в исследовании активности МГТБ были получены в экспериментах, проведенных на роллерных органотипических культурах *in vitro* (Ямскова и др., 2009а; 2012). В условиях роллерного вращения, при котором обеспечивалось отсутствие адгезии клеток к поверхности сосуда, в тканях органотипических культур происходила дополнительная активация клеточных источников регенерации (Григорян и др., 2005; Victorov, 2001). Эти экспериментальные модели оказались оптимальными для изучения биологического действия МГТБ. Следует отметить, что метод роллерного органотипического культивирования тканей менее распространен по сравнению с методом роллерного клеточного культивирования. Впервые роллерное клеточное

культивирование было предпринято в 50–60-е гг. XX в. на клетках сетчатки глаза куриных эмбрионов (Moscona, 1961; 1963). Значительно позже метод роллерного органотипического культивирования тканей был впервые применен при исследовании ткани эмбриональной сетчатки млекопитающих для биотестирования ряда цитокинов (Victorov, 2001), а также при культивировании сетчатки взрослых тритонов с целью исследования ее регенераторных потенций (Григорян и др., 2005). В этих работах было показано, что в данных условиях культивирования происходит накопление малодифференцированных клеток, которые активно пролиферируют и могут быть отнесены к клеточным источникам регенерации в ткани. В условиях отсутствия адгезионного сигнала со стороны подложки в ткани развиваются процессы дедифференцировки клеток, клеточной миграции и пролиферации. Метод роллерного культивирования тканей является эффективным для исследования клеточных источников регенерации в тканях у взрослых особей, по крайней мере, низших позвоночных. В этой связи необходимо отметить, что ткани амфибий, по сравнению с тканями млекопитающих, имеют высокие потенции к регенерации, выдерживают большие сроки культивирования, сохраняя жизнеспособность клеток в условиях *in vitro* (Григорян и др., 2005). Для их культивирования не требуется введение в питательную среду различных биологически активных веществ, которые могут повлиять на активность МГТБ. Были разработаны органотипические культуры таких тканей тритона *Pleurodeles waltl*, как печень, кожа, регенерат хвоста, отдельные структуры глаза, а также целый глаз (Ямскова и др., 2012).

В этих экспериментальных сериях было установлено, что МГТБ оказывают влияние на дифференцировку, увеличивают жизнеспособность клеток, способствуют сохранению структуры ткани и поддерживают в ней межклеточные адгезионные взаимодействия (Ямскова и др., 2012). Важно, что в этих исследованиях было продемонстрировано наличие тканеспецифического, но не видоспецифического, характера биологического действия МГТБ. Так, например, биорегулятор, выделенный из хрусталика глаза быка, способствовал сохранению прозрачности хрусталиков глаза быка, лягушки, крысы, человека (Краснов и др., 2005; Krasnov et al., 2007).

Исследование МГТБ, выделенного из склеры глаза быка, было проведено с применением трех новых экспериментальных моделей *in vitro*: роллерного культивирования ткани склеры, культуры заднего отдела глаза, а также впервые проведенного роллерного культивирования целого глаза тритона (Ямскова и др., 2010а). Было установлено, что модель стационарного (на фильтрах) органотипического культивирования склеры в составе

заднего сектора глаза, а также модель роллерного культивирования целого глаза тритона *Pl. waltl* оказались наиболее эффективными для изучения специфического действия данного МГТБ. На этих экспериментальных моделях удалось выявить протекторное действие биорегулятора, которое выражалось в увеличении жизнеспособности фибробластов склеры, поддержании пространственной организации коллагеновых волокон, а также в способности поддерживать адгезию между тканями заднего отдела глаза и стимулировать статус клеточной дифференцировки ПЭ (Сидорский и др., 2018).

Большое исследование было проведено на роллерной органотипической культуре роговицы глаза тритона (Маргасюк и др., 2008). В этой работе было показано, что при отсутствии адгезионного сигнала (роллерном культивировании) в ткани активируются клеточные источники регенерации — стволовые клетки лимба и стромы, а в присутствии биорегулятора, выделенного из роговицы глаза быка, наблюдается дополнительная их активация (Маргасюк и др., 2008). Здесь следует отметить, что роговица является уникальным объектом исследования клеточного резервного отдела в системах *in vitro*. Исследование лимба — области, расположенной на границе роговицы и склеры — как источника клеток, участвующих в возобновлении и регенерации слоев роговицы была показана в начале 1970-х гг., а поиск веществ, оказывающих влияние на прогениторные клетки области лимба, по-прежнему является актуальным направлением современных биологических исследований (Davanger, Evenson, 1971; Cotsarelis et al., 1989). В зависимости от способа выделения роговицы из глаза (с сохранением области лимба или без данной области) роговица сохраняет либо один (только базальный слой эпителия роговицы), либо два (базальный слой эпителия роговицы и область лимба) клеточных источников регенерации. В связи с этим в эксперименте для культивирования использовали роговицы с сохраненной областью лимба или без данной области. Кроме того, сравнивали состояние роговиц, культивируемых в стационарных условиях и при роллерном вращении. Для оценки состояния роговицы морфометрически оценивали относительную толщину эпителия и стромы.

В результате проведенного исследования было сделано несколько важных выводов. Во-первых, было показано, что в отличие от культивирования на подложке (наличие адгезионного сигнала), роллерный тип культивирования роговицы глаза амфибий способствует активации клеток резервного отдела. Во-вторых, в роговице амфибий влияние биорегулятора выражалось в стимуляции как недифференцированных клеточных источников регенерации — клеток лимба, так и более дифференцированных тканевых прогениторных кле-

ток — клеток базального слоя. В-третьих, в условиях роллерного культивирования роговицы глаза крысы биорегулятор не оказывал влияния на клеточные источники регенерации ткани (клетки лимба), но действовал на клетки базального слоя роговицы, интенсифицируя их переход в дифференцированные эпителиальные клетки (Маргасюк и др., 2008). Способность МГТБ дополнительно активировать клеточные источники в ткани и стимулировать тем самым процессы восстановления и регенерации были показаны и в других экспериментах.

На модели органотипического культивирования предстательной железы мыши *in vitro* была изучена специфическая активность МГТБ, выделенного из ткани предстательной железы быка (Nazarova et al., 2007). При вращении в роллере культивировали отдельно половинки простаты мыши в течение 24 ч. В контроле в ткани железы наблюдали значительную гибель клеток секреторного эпителия и отсутствие выработки секрета. Тем не менее ткань оставалась жизнеспособной (особенно в краевых зонах), сохранялась структура отдельных желез и протоков. При воздействии МГТБ, выделенного из предстательной железы, наблюдали совершенно иную картину: в ткани происходила активная выработка секрета. Отмечалась стимуляция секреторной функции эпителиальных клеток простаты: она оказалась настолько интенсивной, что приводила к истощению и гибели секреторных клеток в условиях органного культивирования железы *in vitro*. Таким образом, в данном исследовании была продемонстрирована способность МГТБ кроме поддержания структуры ткани, межклеточных адгезионных взаимодействий и жизнеспособности клеток, стимулировать секреторную функцию железы (Nazarova et al., 2007).

На органной культуре печени тритона было изучено специфическое действие МГТБ, выделенных из печени и желчи быка (Borisenko et al., 2007). Было показано, что только при роллерном способе культивирования ткани МГТБ, выделенный из печени, способствовал увеличению площади кластеров пигментированных клеток печени тритона — аналогов клеток Купфера печени млекопитающих, но в то же время угнетал пролиферативную активность клеток кроветворения в краевой зоне по сравнению с контролем. Влияние МГТБ, выделенного из желчи, выражалось в уменьшении площади кластеров пигментированных клеток и в ингибировании пролиферативной активности кроветворных клеток в краевой зоне, по сравнению с контролем. Полученные результаты показывают, что данные МГТБ, несмотря на то, что источником их биосинтеза является печень, представляют собой разные вещества, которые различным образом влияют на клетки печени хвостатых амфибий. В этой работе было также

продемонстрировано тканеспецифическое действие МГТБ. Эти данные подтвердили результаты ранее проведенного сравнительного исследования МГТБ, выделенных, соответственно, из ткани нейральной сетчатки и пигментного эпителия глаза млекопитающих (Краснов и др., 2003). В этом исследовании было показано, что несмотря на общее происхождение обеих тканей в эмбриогенезе из нейроэпителия, а также контактного взаимодействия и общего метаболизма в постнатальном периоде, оба МГТБ отличаются структурно и функционально. (Краснов и др., 2003а; Ямскова и др., 2009; Ильина и др., 2011). Биорегулятор из пигментного эпителия поддерживал жизнеспособность биполярных клеток и отростков Мюллеровской глии, а также дифференцированное состояние клеток пигментного эпителия и влиял на сохранение адгезии между сосудистой оболочкой глаза и сетчаткой. Биорегулятор из сетчатки действовал на жизнеспособность самих клеток Мюллера и фоторецепторов сетчатки. Биорегулятор из пигментного эпителия обладал сосудосуживающим, а биорегулятор из сетчатки — сосудорасширяющим действием.

Наиболее изученным является МГТБ, обнаруженный в сыворотке крови позвоночных животных, который у взрослых особей находится в неактивном состоянии (Ямскова, Резникова, 1991). Как и все МГТБ, этот биорегулятор представляет собой БПК, образованный сывороточным альбумином и определенным набором пептидов (Ильина и др., 2011; 2019). В сыворотках крови взрослых особей и эмбрионов млекопитающих этот биорегулятор находится в различном состоянии: во всем постнатальном периоде — в неактивном состоянии из-за образования комплекса с белком-инактиватором, а в первые две трети эмбрионального развития МГТБ присутствует в сыворотке крови в активном состоянии. Было показано, что инактивация данного МГТБ в последней трети эмбриогенеза происходит постепенно: в течение этого периода наблюдалось снижение его активности до полной инактивации к моменту рождения особи (Ямскова, Резникова, 1991). Было сформулировано предположение о том, что МГТБ из сыворотки крови играет важную роль в эмбриональном развитии млекопитающих, а во всем постнатальном периоде присутствует в сыворотке в неактивном состоянии, образование которого представляется оптимальным способом депонирования этого биологически активного вещества в организме.

Исследование влияния сывороточного биорегулятора на культуру фибробластов млекопитающих *in vitro* продемонстрировало его рост-стимулирующее действие (Буеверова и др., 1985). Было установлено, что биорегулятор стимулирует пролиферацию фибробластов млекопитающих только в лог-фазе, то есть при условии восстановления

адгезии клеток к подложке и формирования их межклеточных взаимодействий. Эти данные указывают на присутствие на поверхности определенных сайтов связывания с МГТБ. В отличие от клеток, находящихся в лог-фазе роста, клетки, обработанные трипсином при пересеве и помещенные в среду, содержащую МГТБ, не были способны к взаимодействию с ним. Полученные результаты показывают, что данный биорегулятор стимулирует пролиферативные свойства фибробластов в лог-фазе, когда происходит восстановление белков клеточной поверхности, нарушенных при обработке трипсином. Аналогичные данные были получены в той же экспериментальной серии при изучении влияния МГТБ из сыворотки на клонирование фибробластов *in vitro*: для проявления его биологического действия необходимо было сохранение поверхностных белков клеток (Буеверова и др., 1985). При исследовании активности других МГТБ была также продемонстрирована необходимость сохранения белкового состава поверхности клеток-мишеней (Ямскова и др., 1990).

Таким образом, в исследовании, проведенном на монослойной культуре фибробластов млекопитающих, была установлена способность МГТБ, выделенного из сыворотки крови, оказывать влияние на адгезивные и пролиферативные свойства этих клеток *in vitro*.

МГТБ из сыворотки крови стимулировал ранозаживление поврежденной роговицы у кроликов *in vivo* (Константиновский и др., 2012), кожных ран у мышей *in vivo* (Стрецкий и др., 2011), стимулировал процессы остеогенеза при повреждении хрящевой и костной тканей у крыс *in vivo* и *in vitro* (Рыбакова и др., 2009, 2014; Шайхалиев и др., 2013, 2019). Во всех этих экспериментах была отмечена способность МГТБ из сыворотки не только активировать процессы заживления экспериментальных ран, но и стимулировать процессы восстановления по механизму эпиморфной регенерации (Ямскова и др., 2010б). Например, в опытах, проведенных на модели экспериментальной кожной раны у мышей *in vivo* было показано, что МГТБ дополнительно активирует стволовые ниши волосяного фолликула, а также прогениторные клетки эпидермиса, в результате чего наблюдается восстановление структуры ткани кожи, вплоть до потовых и сальных желез и мышечных волокон (Стрецкий и др., 2011).

На моделях повреждения костной ткани у крыс *in vivo* было показано, что данный МГТБ способствовал быстрому восстановлению экспериментального дефекта кости, а также вызывал восстановление хрящевой ткани. При включении МГТБ, выделенного из сыворотки крови, в различные композиции — хитозановый гель, содержащий гидроксипапатит, или же в криогелевые

конструкции на основе альбумина или альгината, не зависимо от материала их основы, — во всех случаях отмечалась активная репарация кости (Шайхалиев и др., 2013, 2019; Краснов и др., 2019). Именно за счет действия биорегулятора, начиная с 7–14-х сут после операции, в области дефекта наблюдали восстановление плотной костной ткани и остеонров, формирование костного мозга. Через 14 дней после операции отмечалось заполнение свободного пространства в полости дефекта регенерирующей костной тканью, а к 30-м сут — полное восстановление гистоструктуры по механизму эпиморфной регенерации. На ранних сроках у животных контрольных групп (без воздействия биорегулятора) отмечали формирование плотной волокнистой ткани и губчатой кости, а на поздних сроках — заполнение дефекта соединительно-тканевыми элементами (Шайхалиев и др., 2013, 2019; Краснов и др., 2019).

На новой модели органотипического культивирования регенератов хвостов взрослых тритонов *Pleurodeles waltl* было показано, что биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, проявлял морфогенетическое действие в концентрации, соответствующей  $10^{-4}$  мг белка/мл, которое выражалось в сохранении хрящевой и мышечной тканей регенерата, а также структуры кожи и подкожных желез. Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными, которые показали, что данный МГТБ в высокой концентрации стимулировал регенерацию конечности у лягушки *Xenopus laevis in vivo* (Тучкова и др., 1992; Aguillon-Gutierrez et al., 2020). Действие МГТБ, выделенного из костной ткани млекопитающих (крыса, бык), было иным: он тканеспецифично увеличивал жизнеспособность клеток хрящевой ткани и способствовал поддержанию ее структуры. При его воздействии наблюдали полностью сохраненную структуру хрящевой ткани, отсутствие гибели клеток, а также начало сегментации хряща, характерное для данной стадии его развития. Под многослойным эпителием в кориуме были обнаружены зрелые железы с секретом, пигментированные клетки, в отличие от контрольной серии (без воздействия МГТБ из костной ткани), где были отмечены развитие процессов деградациии ткани и массовая гибель клеток. Следует отметить, что в этом исследовании было установлено, что МГТБ, выделенный из костной ткани млекопитающих, проявлял протекторное действие только в низких концентрациях, соответствующих  $10^{-11}$ – $10^{-14}$  мг белка/мл; в более высоких концентрациях, соответствующих  $10^{-3}$ – $10^{-7}$  мг белка/мл, этот биорегулятор не был активен. Концентрационную зависимость биологического действия МГТБ отмечали во многих экспериментах: биорегуляторы этой группы оказывали протекторное действие на ткань, вызывали увеличение жизнеспособности клеток в условиях *in vitro*,

а также демонстрировали свое ранозаживляющее свойство в условиях *in vivo*, только в очень низких концентрациях (Ямскова и др., 2009, 2012).

Таким образом, экспериментальные серии, проведенные по исследованию биологического действия МГТБ, выделенных из различных тканей животных, показали, что биорегуляторы этой группы оказывают влияние на свойства ПМ клеток, способствуют поддержанию межклеточных адгезионных взаимодействий в тканях. МГТБ также способны стимулировать регенерацию и процессы восстановления в патологически измененных (травмированных) тканях за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации в тканях. Их биологическая активность характеризуется наличием тканеспецифического, но не видоспецифического действия. Следует также отметить, что свое специфическое действие биорегуляторы данной группы проявляют в низких концентрациях. Эти данные предполагают существование в тканях позвоночных животных ранее не изученного механизма проведения регуляторного сигнала, в котором важнейшая роль отводится биологическим жидкостям, а вода является матрицей для передачи информации (Ямскова, Ямсков, 1999; Babushkina et al., 2005).

#### МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МГТБ

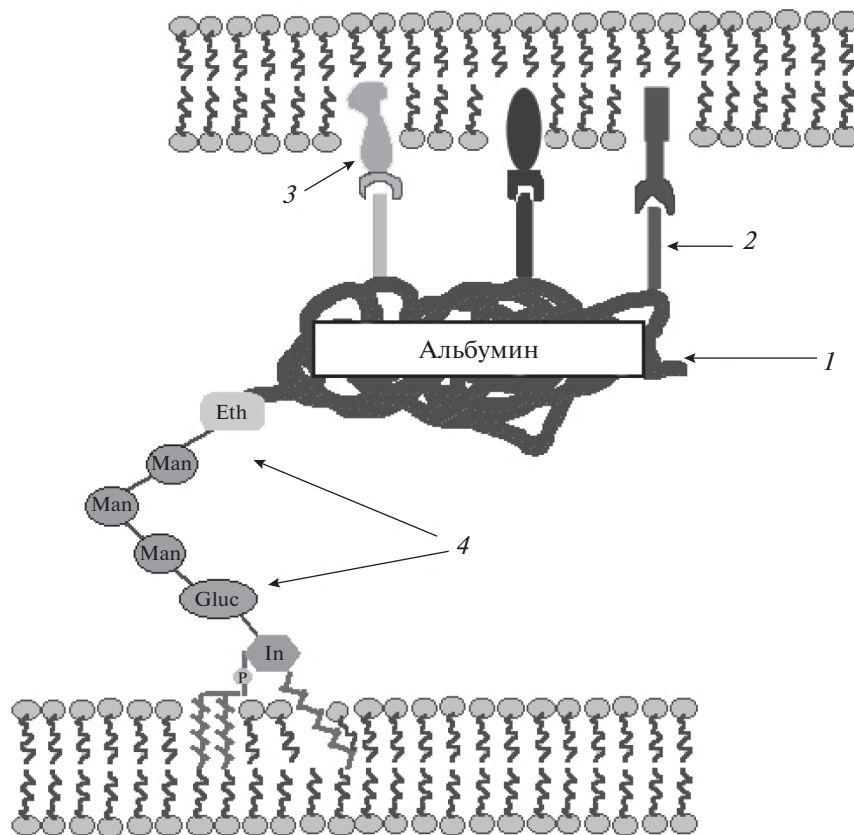
На основании полученных результатов было сформулировано предположение о том, что механизм биологического действия МГТБ обусловлен их мембранотропной активностью, то есть способностью изменять вязкоупругие свойства ПМ клеток (Ямскова, Резникова, 1979). Позднее, при исследовании проницаемости ПМ гепатоцитов крыс было установлено, что в присутствии МГТБ наблюдается ее изменение для  $H^3$ -лейцина (Ямскова и др., 1994).

Было установлено, что мембранотропная активность биорегуляторов этой группы проявлялась только в условиях сохранения целостности структуры межклеточного пространства ткани (Ямскова и др., 1990, 1994). Например, МГТБ не влияли на свойства ПМ гепатоцитов на модели суспензионных культур, а также органной культуры печени млекопитающих, предварительно перфузированной физиологическим раствором, содержащим ионы кальция (Ямскова и др., 1990, 1994). Эти данные позволяют предположить существование в межклеточном пространстве тканей животных определенной супрамолекулярной структуры, выполненной сложными ансамблями МГТБ, основной функцией которой является участие в адгезионном процессе, а именно в обеспечении строго определенного позиционного распределения на поверхности клетки молекул адгезии, сопряженных с путями регуляторной

трансдукции, обеспечивающей распространение по ткани и проведение информационного сигнала в клетку (Напсоск, 2005). Такая структура была названа “малый матрикс” (Ямскова, Ямсков, 1999).

Как показывают результаты проведенных в последние десятилетия исследований механизмов, лежащих в основе процессов регуляторной трансдукции, важнейшая роль в их осуществлении отводится механическим свойствам таких структур, как ПМ, ВКМ (внеклеточный матрикс), цитоскелет, ядерная ламина. С одной стороны, эти супрамолекулярные структуры участвуют в процессах клеточной адгезии, формообразования, а, с другой, — являются участниками путей проведения регуляторного сигнала (Vining, Mooney, 2017; Smith et al., 2018). Именно такое сопряжение составляет основу регуляции всех основных биологических процессов. Эти супрамолекулярные структуры межклеточного пространства и клетки имеют определенную архитектуру, которая может изменяться в зависимости от воздействия различных физико-химических факторов. Все эти структуры связаны между собой в единую интегральную систему, пронизывающую все ткани организмов. Эта интегральная тканевая система (ИТС) исключительно динамична, она может изменяться в отдельных областях, и это изменение за счет перестройки ее архитектуры будет распространяться по всей ИТС. Поэтому изменение пространственной организации, например, ВКМ, сразу будет воспринято другими структурами ИТС, вплоть до ядерной ламина, что, в свою очередь, вызовет изменение в работе генетического аппарата и приведет к соответствующим изменениям в направленности биологического процесса (Bissel et al., 1982). Постоянно существующая динамика процессов клеточной адгезии, обусловленная изменением химического состава внутренней среды организма, а также физических параметров среды обитания организма, приводит к постоянно возникающему “ответу” организма на эти изменения. На наш взгляд, изменение свойств ИТС является основным механизмом эпигенетической регуляции биологических процессов. В свете этих предположений ПМ занимает особое место в пространственной организации ИТС, поскольку ее роль в “дирижировании” процессами регуляторной трансдукции принципиальна. Это связано с местоположением ПМ — она принадлежит одновременно внеклеточному и внутреннему пространству клетки, и именно в ПМ локализованы молекулы, воспринимающие внеклеточные регуляторные сигналы, и берут начало регуляторные пути. Поэтому состояние липидного слоя ПМ исключительно важно для осуществления лигандо-рецепторного взаимодействия, которое является началом (триггером) прохождения любого регуляторного сигнала в





**Рис. 1.** Предполагаемая схема взаимодействия молекулы альбумина, входящего в состав наноразмерных частиц МГТБ, с ПМ двух контактирующих клеток.

1 – альбумин (изоформа), функционирует как шаперон; 2 – пептиды, которые являются продуктами протеолиза адгезивных белков и сохраняют способность взаимодействия с рецепторами; 3 – рецепторы к адгезивным и мембранным белкам, которые подверглись протеолитическому гидролизу; 4 – мембранный якорь (например, фосфатидилинозитольный) с олигосахаридным кором, к которому через С-концевой домен присоединен сывороточный альбумин (изоформа).

клетку. Изменение конформации рецептора, разрешающее взаимодействие с ним лиганда, является ключевым событием, регулирующим прохождение внутриклеточного сигнала по принципу “да–нет”. Этот механизм особо важен в работе ниш стволовых клеток, регуляция которых формирует основу для регенеративных процессов организма. Состояние ПМ определяется не только составом (строением) липидов, но и латеральной подвижностью липидов и мембранных белков. МГТБ, влияющие на вязкоупругие свойства ПМ и изменяющие ее проницаемость, участвуют в процессах регуляторной трансдукции, “разрешая” прохождение регуляторного сигнала по тому или иному пути.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Существует предположение, что МГТБ участвуют в гетерофилическом молекулярном механизме клеточной адгезии, а биологически активные пептиды, входящие в состав МГТБ, являются про-

дуктами протеолиза компонентов межклеточного пространства, в том числе адгезивных белков, белков ВКМ, которые постоянно обновляются за счет работы ферментов межклеточного пространства, например, матричных металлопротеаз (Lemaître, D’Armiento, 2006). При этом образовавшиеся в результате протеолиза пептиды могут сохранить специфическое связывание с соответствующими рецепторами ПМ. Входящий в состав МГТБ альбумин, действуя как внеклеточный шаперон, организует пептиды в качестве таких специфических лигандов (Marini et al., 2005, Wyatt et al., 2013). Согласно этим представлениям, СА является компонентом межклеточного пространства тканей и участвует в процессах клеточной адгезии. Предполагается, что С-конец СА может быть связан с системой мембранного (например, фосфатидилинозитольного) якоря, который имеет сложное строение и включает олигосахаридный кор, содержащий маннозид, глюкозамин, фосфоэтаноламин, а также собственно инозитольный якорь с жирными кислотами, с помощью которого

БПК взаимодействует с бислоем ПМ клетки (рис. 1). Кроме того, в состав МГТБ входят липиды, которые, с одной стороны, могут способствовать поддержанию определенной конформации сформировавшегося БПК, а, с другой, — участвовать в образовании крупных наноразмерных частиц МГТБ, которые необходимы для проявления их активности. На наш взгляд, представленная на рис. 1 схема наиболее полно объясняет экспериментальные данные, полученные при изучении свойств, локализации и характера биологической активности МГТБ. Здесь следует также учесть, что на рис. 1 показано взаимодействие с ПМ одного БПК, входящего в состав крупных наноразмерных частиц биорегуляторов. БПК в наночастицах взаимодействуют между собой и с пептидами, формируя определенную архитектуру строения образовавшихся супрамолекулярных структур. Именно, такое состояние биорегуляторов определяет их биологическое действие.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют 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

- Бугверова Э.И., Брагина Е.В., Резникова М.М. и др. Действие адгезионного фактора сыворотки крови на пролиферацию клеток млекопитающих *in vitro* // ДАН СССР. 1985. Т. 281. № 1. С. 158–160.
- Григорян Э.Н., Краснов М.С., Алейникова К.С. Ротационное культивирование изолированной сетчатки тритона как способ получения малодифференцированных, пролиферирующих клеток *in vitro* // ДАН. 2005. Т. 405. № 4. С. 566–570.
- Ильина А.П., Куликова О.Г., Мальцев Д.И. и др. Идентификация новых пептидов из межклеточного пространства методом MALDI-TOF масс-спектрометрии // Прикл. биохим. микробиол. 2011. Т. 47. № 2. С. 135–140.
- Ильина А.П., Молявка А.А., Ямскова В.П. и др. Исследование структуры биорегулятора, выделенного из головного мозга крыс // Прикл. биохим. микробиол. 2014. Т. 50. № 4. С. 442–448.
- Ильина А.П., Сидорский Е.В., Елистратов П.А. и др. Анализ изоформ альбумина сыворотки, входящих в состав мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, выделенных из различных тканей млекопитающих // Прикл. биохим. микробиол. 2019. Т. 55. № 4. С. 350–355.
- Казанский Д.Б., Анфалова Т.В., Хромых Л.М. и др. Регуляция иммунитета Т-лимфоцитами: роль низкомолекулярных адгезивных гликопротеинов тимуса // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 4. С. 276–277.
- Константиновский А.А., Краснов М.С., Ямскова В.П. и др. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка, на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов *in vivo* // БЭБМ. 2012. № 2. С. 177–182.
- Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. Регуляторные белки тканей глаза позвоночных // Радиацион. биол. радиоэкол. 2003а. № 3. С. 265–268.
- Краснов М.С., Григорян Э.Н., Ямскова В.П. Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов // Изв. АН. Серия биол. 2003б. № 1. С. 22–36.
- Краснов М.С., Гурмизов Е.П., Ямскова В.П. и др. Исследование влияния регуляторного белка, выделенного из хрусталика глаза быка, на катарактогенез у крыс *in vitro* // Вестн. офтальмол. 2005. Т. 121. № 1. С. 37–39.
- Краснов М.С., Шайхалиев А.И., Коршаков Е.В. и др. Индукция остеогенеза костной ткани крысы с использованием криогенно-структурированных пористых 3D-материалов с содержанием биорегулятора // БЭБМ. 2019. Т. 168. № 7. С. 113–117.
- Маргасюк Д.В., Краснов М.С., Ямсков И.А. и др. Роль регуляторного белка, выделенного из роговицы глаза быка, в активации клеточных источников регенерации роговицы *in vitro* // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 6. С. 736–745.
- Назарова П.А., Краснов М.С., Ямскова В.П. Регуляторный белок, выделенный из молока крупного рогатого скота // Прикл. биохим. микробиол. 2006. Т. 42. № 5. С. 529–533.
- Рыбакова Е.Ю., Краснов М.С., Ильина А.П. и др. Влияние биорегуляторов, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на состояние регенератов хвостов тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro* // Фундам. исслед. 2014. № 5. С. 283–289.
- Рыбакова Е.Ю., Краснов М.С., Ямскова В.П. и др. Новый биорегулятор, выделенный из костной ткани крыс: физико-химические свойства, влияние на хрящевую ткань *in vitro* // ДАН. 2009. Т. 427. № 1. С. 136–138.
- Сидорский Е.В., Ильина А.П., Краснов М.С. и др. Физико-химические свойства и биологическая активность пептидно-белкового комплекса из ткани склеры глаза быка // Прикл. биохим. микробиол. 2018. Т. 54. № 1. С. 82–88.
- Стрецкий Г.М., Краснов М.С., Рыбакова Е.Ю. и др. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей // Клет. технол. биол. мед. 2011. № 4. С. 211–214.
- Тучкова С.Я., Ямскова В.П., Резникова М.М. Действие 6-Д полипептида из сыворотки крови млекопита-

- ющих на регенерацию передней конечности у шпорцевых лягушек // Онтогенез. 1992. Т. 23. № 3. С. 319–320.
- Шайхалиев А.И., Краснов М.С., Вахрушев И.В. и др. Влияние биоактивного пептидного комплекса, выделенного из сыворотки крови быка, на пролиферацию и миграцию МСК *in vitro*, а также на восстановление костных дефектов *in vivo* // Клет. техн. биол. мед. 2019. № 3. С. 213–220.
- Шайхалиев А.И., Стречий Г.М., Краснов М.С. и др. Действие новых композиций на восстановление костных дефектов у крыс в эксперименте // Фундамент. исслед. 2013. № 9. Ч. 2. С. 271–276.
- Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С. и др. Физико-химические свойства биологически активных в микродозах регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих // Изв. РАН. Сер. хим. 2009. № 3. С. 623–628.
- Ямскава В.П. Роль ионов кальция в стабилизации адгезионного фактора печени крыс // Биофизика. 1978. Т. 23. С. 428–432.
- Ямскава В.П., Резникова М.М. Роль макромолекулярных компонентов клеточной поверхности в специфической адгезии клеток // Успехи биол. химии. 1979. Т. 20. С. 95–112.
- Ямскава В.П., Резникова М.М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию // Журн. общ. биол. 1991. Т. 52. № 2. С. 181–191.
- Ямскава В.П., Ямсков И.А. Механизм биологического действия физико-химических факторов в сверхмалых дозах // Рос. хим. журн. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). 1999. Т. 43. № 2. С. 74–79.
- Ямскава В.П., Краснов М.С., Скрипникова В.С. и др. Экспериментальные модели культивирования тканей глаза тритона *Pleurodeles waltl* для исследования специфического действия активного в сверхмалых дозах биорегулятора склеры // Бюл. экспер. биол. и мед. 2010а. № 4. С. 393–395.
- Ямскава В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. М.: Макс Пресс, 2009а. 82 с.
- Ямскава В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. К вопросу о механизмах, лежащих в основе процессов восстановления и репарации в тканях // Клет. техн. биол. и мед. 2010б. № 1. С. 32–35.
- Ямскава В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Acad. Publishing, 2012. 136 p.
- Ямскава В.П., Нечаева Н.В., Туманова Н.Б. и др. Исследование влияния макромолекулярных адгезионных факторов, выделенных из сыворотки крови и печени млекопитающих на интенсивность синтеза белка и содержание АТФ в гепатоцитах *in vitro* // Изв. РАН. Серия биол. 1994. № 2. С. 190–196.
- Ямскава В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А. и др. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Прикл. биохим. микробиол. 2004. Т.40. № 4. С. 407–413.
- Ямскава В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А. и др. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка // Биохимия. 2009б. Т. 74. № 9. С. 1195–1203.
- Ямскава В.П., Туманова Н.Б., Логинов А.С. Сравнительное исследование действия экстрактов печени мышей линии С57В1 и СВА на адгезию гепатоцитов // Бюл. экспер. биол. и мед. 1990. № 3. С. 303–306.
- Aguillon-Gutierrez D.R., Krasnov M.S., Burlakova O.V. et al. Effects of endogenous bioregulators from mammalian blood serum and bone tissue on amphibian limb regeneration // J. Cyt. Tiss. Biol. 2020. V. 7. P. 025. <https://doi.org/10.24966/CTB-9107/100025>
- Babushkina T.A., Klimova T.P., Yamskov I.A. et al. Spin-lattice relaxation of water protons in serum adhesion protein (SAP) solutions of ultralow concentrations // J. Mol. Liq. 2005. V. 122. P. 84–86.
- Bissell M., Hall H., Parry G. How does extracellular matrix direct gene expression? // J. Theor. Biol. 1982. V. 99. P. 31–68.
- Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al. Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultralow doses // Biochemical physics frontal research / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov, Hauppauge, NY: Nova Sci. Publishers Inc., 2007. 35–44.
- Cotsarelis G., Cheng G., Dong G. et al. Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells can be preferential stimulated to proliferate: implication on epithelial stem cells // Cell. 1989. V. 57. P. 201–209.
- Davanger M., Evenson A. Role of the pericorneal structures in renewal of corneal epithelium // Nature. 1971. V. 229. P. 560–561.
- Hancock J.T. Cell signaling. NY: Oxford Univ. Press Inc., 2005. 296 p.
- Ilyina A.P., Sidorsky E.V., Tregubov A.V. et al. Peptide–protein complex from cattle sclera: structural aspects and chaperone activity // Biochem. Biophys. Rep. 2020. V. 24. P. 1–10.
- Immunoassays: a practical approach / Ed. J.P. Gosling. Oxford: Oxford Univ. Press, 2000. P. 19–36.
- Lapillonne A., Clarke S.D., Heird W.C. Polyunsaturated fatty acids and gene expression // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2004. V. 7. № 2. P. 151–156.
- Lemaître V., D'Armiento J. Matrix metalloproteinases in development and disease // Birth Def. Res. C Embryo Today. 2006. V. 78 (1). P. 1–10.
- Kragh-Hansen U., Minchiotti L., Galliano M. et al. Human serum albumin isoforms: genetic and molecular aspects and functional consequences // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 12. P. 5405–5417.
- Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P. et al. Analysis of a regulatory peptide from the bovine eye lens: physicochemical properties and effect on cataract development *in vitro* and *in vivo* // Biochemical physics frontal research / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov, Hauppauge, NY: Nova Sci. Publishers Inc., 2007. P. 21–33.

- Marini I., Moschini R., Del Corso A., Mura U. Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with  $\alpha$ -crystallin // *Cell. Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. P. 3092–3099.
- Moscona A.A. Rotation — mediated histogenetic aggregation of dissociated cells // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 22. P. 455–465.
- Moscona A. Studies of cell aggregation: demonstration of material with selective cell-binding activity // *PNAS USA*. 1963. V. 49. P. 743–748.
- Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al. Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their secretions // *New trends in biochemical physics research* / Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. NY, Nova Sci. Publishers Inc., 2007. P. 73–82.
- Peters T. Jr. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. San Diego, CA: Academic Press, 1996. 432 p.
- Reichardt L.F. Extracellular matrix molecules and their receptors // *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins* / Eds T. Kreis, R. Vale. Oxford: Oxford Univ. Press, 1993. 176 p.
- Sathyamoorthy N., Decker J.M., Sherblom A.P., Muchmore A. Evidence that specific high mannose structures directly regulate multiple cellular activities // *Mol. Cell. Biochem.* 1991. V. 102. P. 139–147.
- Sharon N., Lis H. Lectins. London, New York: Chapman and Hall, 1989. 127 p.
- Smith L.R., Cho S., Discher D.E. Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics // *Physiology (Bethesda)*. 2018. V. 33. № 1. P. 16–25.
- Victorov I.V., Lyjin A.A., Aleksandrova O.P. A modified roller method for organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus // *Brain Res. Prot.* 2001. V. 7. P. 30–37.
- Vining K.H., Mooney D.J. Mechanical forces direct stem cell behavior in development and regeneration // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. P. 728–742.
- Weigel P.H. Rat hepatocytes bind to synthetic galactoside surfaces via a patch of asialoglycoprotein receptors // *J. Cell. Biol.* 1980. V. 87. P. 855–861.
- Weigel P.H., Schmell E., Lee Y.C., Roseman S. Specific adhesion of rat hepatocytes to beta-galactosides linked to polyacrylamide gels // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253 (2). P. 330–333.
- Wyatt A.R., Yerbury J.J., Ecroyd H. et al. Extracellular chaperones and proteostasis // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. V. 82. P. 2.1–2.28.
- Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu. et al. Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultralow doses: 2. Tissue localization and role in wound healing / *Biochemical physics frontal research* // Eds S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov, G.E. Zaikov. Hauppauge, NY: Nova Sci. Publishers Inc., 2007. P. 71–78.

## The Role of Serum Albumin in the Conduction of a Regulatory Signal in Mammals

M. S. Krasnov<sup>a, \*</sup>, A. P. Ilyina<sup>b</sup>, and V. P. Yamskova<sup>b, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>b</sup>Institute of Problems of Bioregulation, Moscow, Russia

\*e-mail: embrmsk@mail.ru

\*\*e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

A review of data on the study of the structure, physicochemical properties and biological activity of protein-peptide complexes, localized extracellularly, participating in intercellular adhesion and activating cellular sources of regeneration in vertebrate tissues, is presented. Protein-peptide complex consists of certain isoforms of serum albumin and peptides — products of proteolysis of known membrane and adhesion proteins. The biological effect of protein-peptide complexes is characterized by the presence of tissue, but the lack of species specificity, as well as dose dependence. In solutions, protein-peptide complexes are in the form of nanosized particles; this state is associated with the manifestation of protein-peptide complex biological activity. A possible mechanism of the protein-peptide complexes structure and its interaction with the cell plasma membrane is considered.

**Keywords:** albumin, serum, bioregulators

УДК 616-006.446:615.28:57.053

## МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

© 2021 г. Н. М. Боброва<sup>1</sup>, Т. В. Романовская<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

\*e-mail: ramanouskaya\_tv@bsu.by

Поступила в редакцию 28.02.2021 г.

После доработки 04.03.2021 г.

Принята к публикации 04.03.2021 г.

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — совокупность гематологических заболеваний, характеризующихся клональной экспансией незрелых миелоидных предшественников. Химиотерапия является одним из основных методов лечения ОМЛ. Однако возникновение лекарственной устойчивости у лейкозных клеток, являясь серьезным препятствием для терапии заболевания, ухудшает клинический исход. Для разработки грамотных стратегий лечения ОМЛ необходимо понимать суть механизмов резистентности к тем или иным цитостатикам и цитотоксическим препаратам. Данный обзор посвящен различным известным на сегодняшний день механизмам, лежащим в основе возникновения лекарственной устойчивости у лейкозных клеток на уровне внутриклеточных молекулярных путей и на уровне межклеточной коммуникации.

**Ключевые слова:** острый миелоидный лейкоз, химиотерапия, химиорезистентность

**DOI:** 10.31857/S0042132421040025

### ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой совокупность фенотипически и генотипически гетерогенных гематологических заболеваний, которые характеризуются клональной экспансией слабодифференцированных миелоидных предшественников (Lagunas-Rangel et al., 2017). Образование лейкозных клеток и их экспансия обусловлены возникновением в клетке-предшественнице гемопоэза мутации, вследствие которой происходит блок дифференцировки и начинается неконтролируемая пролиферация незрелых миелоидных клеток (Савченко и др., 2014). В результате происходит аномальное накопление таких клеток в периферической крови и костном мозге, реже — в других органах (De Kouchkovsky, Abdul-Hay, 2016; Lagunas-Rangel et al., 2017). Таким образом, сценарии развития гемобластозов и солидных опухолей имеют много общих черт. Во-первых, определенные мутации и эпигенетические изменения ведут к избыточному размножению отдельных клонов. Во-вторых, в аномальных клетках генерируются собственные сигналы пролиферации, а ингибирующие ее сигналы ими не воспринимаются. В-третьих, не запускаются процессы гибели незрелых миелоидных клеток в результате апоптоза или уничтожения их иммунной системой. Тем не менее,

главной причиной смерти больных ОМЛ является недостаточность функции костного мозга, то есть способность метастазировать вносит меньший вклад в патогенез ОМЛ, чем в случае солидных опухолей (Копнин, 2012). По количеству летальных исходов от онкологических заболеваний острый миелоидный лейкоз находится на шестом месте (Du, Chen, 2017).

Химиотерапия является основным и в некоторых случаях единственным способом лечения онкологических заболеваний (Блохин, 2005). Так, классический режим лечения ОМЛ включает в себя внутривенное введение цитарабина на протяжении семи дней и одновременное введение на протяжении первых трех дней этого срока даунорубицина (режим “7+3”) (Gabra, Salmena, 2017). Возникновение лекарственной устойчивости у клеток ОМЛ может существенно осложнить лечение заболевания.

Невосприимчивость к препаратам, развивающаяся в процессе проведения химиотерапии, вызывает рецидив болезни, ухудшая тем самым клинический исход. В связи с этим для грамотного выбора терапевтического режима необходимо понимать суть молекулярных механизмов, лежащих в основе явления лекарственной устойчивости (Zheng, 2017).

**Таблица 1.** Основные группы противоопухолевых препаратов, применяемых при лейкозах

| Группа (с примерами)                                                                               | Принцип действия                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I. Алкилирующие агенты (бусульфан, производные нитрозомочевины) и соединения платины (цисплатин)   | Вызывают формирование аддуктов в ядерной ДНК, способствуя образованию межнитевых и внутринитевых поперечных сшивок в ДНК и блокируя таким образом прохождение контрольных точек клеточного цикла |
| II. Антиметаболиты (метотрексат, гемцитабин, цитарабин, азациитидин, гидроксимочевина)             | Аналоги естественных субстратов клеточных ферментов, ингибирующие синтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот по конкурентному механизму                                                             |
| III. Препараты, действующие на микротрубочки (винбластин, доцетаксел, колхицин)                    | Подавляют полимеризацию или деполимеризацию тубулинов, нарушая формирование веретена деления                                                                                                     |
| IV. Ингибиторы топоизомераз (этопозид, даунорубин, митоксантрон и др. антрациклиновые антибиотики) | Нарушают синтез нуклеиновых кислот, интеркалируя в ДНК и взаимодействуя с топоизомеразами                                                                                                        |
| V. Ингибиторы протеинкиназ (гефитиниб, иматиниб и др.)                                             | Подавляя активность протеинкиназ, препятствуют фосфорилированию белков, участвующих в стимуляции пролиферации и подавлении апоптоза клеток                                                       |
| VI. Ингибиторы белкового синтеза (L-аспарагиназа, омацетаксин)                                     | L-аспарагиназа нарушает синтез белка вследствие разрушения некоторых аминокислот; омацетаксин непосредственно ингибирует белки рибосом                                                           |
| VII. Вещества, действующие на клеточные мембраны (пептидные препараты)                             | Изменяют барьерные свойства мембраны митохондрий, способствуя инициации апоптоза                                                                                                                 |

Нарушая те или иные функции в физиологии клеточного деления и клеточного метаболизма, противоопухолевые препараты стимулируют старение и апоптоз лейкозных клеток. Сводная информация по основным группам применяемых в терапии ОМЛ препаратов и механизмам их действия приведена в табл. 1 (составлена по Гольдберг, Матяш, 2017; Constance, Lim, 2012; Valdez et al., 2012; Kartanjan et al., 2015; Liu et al., 2016b; Bertuccio et al., 2017; Visconti, Grieco, 2017).

Из исследований последних лет можно сделать вывод о том, что устойчивые к химиотерапии клоны в основном возникают из-за мутаций в лейкозных стволовых клетках. Как и другие стволовые клетки, они обладают свойством плюрипотентности и способны самовоспроизводиться в присутствии клеток микроокружения. Последние образуют особые регуляторные ниши, предназначенные для поддержания стволовых клеток и защиты их от неблагоприятных воздействий. Лейкозные стволовые клетки способны конкурировать с нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками, вытесняя последние из таких ниш (Tabe, Konopleva, 2014; Corces et al., 2017). Многообразие механизмов, приводящих к появлению резистентности ОМЛ, можно свести к нескольким ключевым аспектам клеточной физиологии (рис. 1). Мы представляем обзор основных путей, которые вовлечены в развитие лекарственной устойчивости при лейкозах и, в частности,

при ОМЛ, с учетом результатов недавних исследований. Также мы приводим сведения о препаратах, которые позволяют воздействовать на те или иные механизмы лекарственной устойчивости, подавляя их и тем самым повышая эффективность действия лекарств при их комбинированном применении.

## ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА ABC

Функция белков данного семейства (ABC, ATP-binding cassette protein) заключается в детоксикации клеток за счет активного транспорта из них токсических молекул. Основные члены этой группы – Р-гликопротеин (P-gp), также имеющий синонимичное название MDR1 (multidrug resistance protein 1) и белок MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1). Гиперэкспрессия Р-gp часто наблюдается в случаях ОМЛ с повышенным риском (Lainey et al., 2012). Р-gp представляет собой гликозилированный интегральный мембранный белок с молекулярной массой 170 кД. После связывания вещества с внутриклеточным доменом белка-транспортера, обращенным в цитозоль, происходит АТФ-зависимое изменение конформации белка, и вещества выводятся во внешнее пространство. Гидролиз АТФ необходим для каждого нового цикла связывания и выведения молекул субстрата из клетки (Du, Chen, 2017).

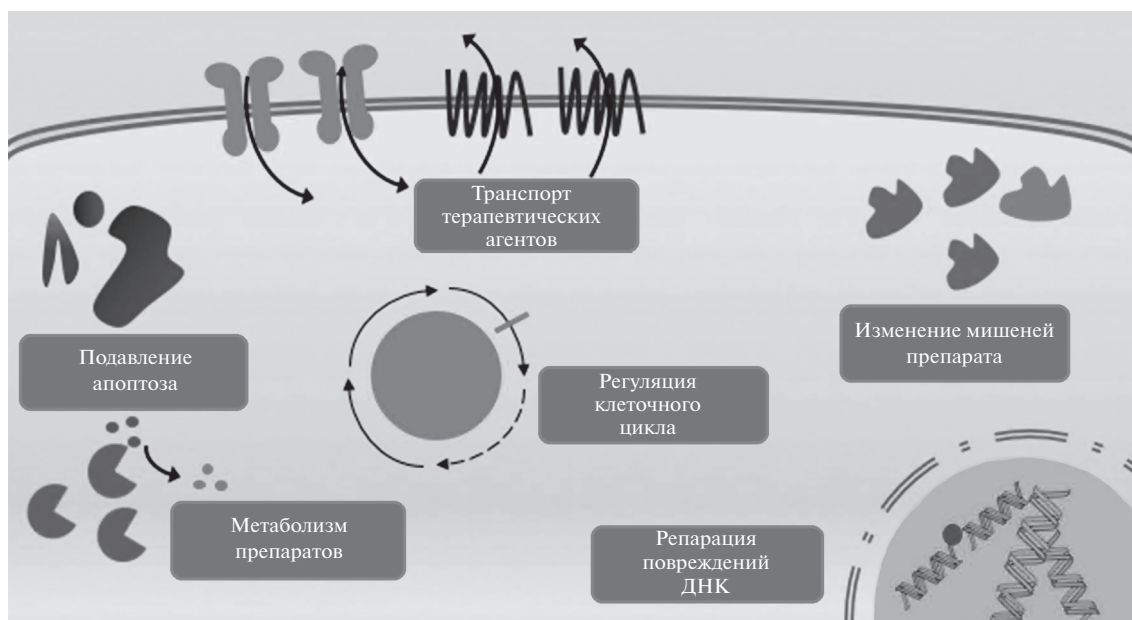


Рис. 1. Шесть ключевых событий, с которыми связано возникновение лекарственной устойчивости (адаптирован по: Gabra, Salmena, 2017).

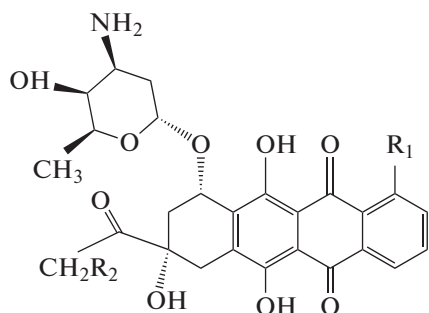
В норме Р-гр способствует поддержанию клеточного гомеостаза, препятствуя накоплению в цитоплазме токсических веществ. С другой стороны, его экспрессия на раковых клетках снижает эффективность действия терапевтических препаратов. Во многих исследованиях показана положительная зависимость между активностью Р-гр и значениями  $IC_{50}$  (полумаксимальной ингибирующей концентрации) цитотоксических препаратов. Так, по результатам одного из исследований (Tang et al., 2009) значение  $IC_{50}$  для препарата DM4 (ингибитор полимеризации тубулинов, производное майтанзина) в полученной устойчивой линии K562/ННТ40 (хронический миелоидный лейкоз) при обработке зосуквидаром – специфическим ингибитором данного транспортера – снизилось с  $18.4 \pm 1.2$  до  $6.5 \pm 0.6$  нМ. В работе (Laineu et al., 2012) показано ингибирующее действие эрлотиниба и гефитиниба в отношении транспортных белков семейства ABC. Применение азациитидина в сочетании с одним из этих веществ обеспечивало более эффективную гибель клеток ОМЛ (как модельных линий, так и первичных культур от пациентов), чем в случае одиночного воздействия азациитидина. Интересно, что первоначально противоопухолевый эффект этих соединений связывали с их способностью подавлять киназную активность рецепторов эпидермального фактора роста. С тем же механизмом оказалось ассоциировано синергическое действие на линии ОМЛ эрлотиниба с этакридином. Этакридин нарушает работу ферментов метаболизма в клетках, индуцируя формирование повы-

шенного количества активных форм кислорода (АФК). Комбинирование его с эрлотинибом обеспечило более высокий уровень накопления АФК в клетках ОМЛ (Rotin et al., 2016).

Субстраты Р-гр разнообразны по своей химической структуре. Так, повышенная экспрессия Р-гр вызывает устойчивость к антрациклиновым антибиотикам, алкалоидам барвинка, пептидным антибиотикам и т.д. (Du, Chen, 2017; Hano et al., 2018). Вместе с тем следует отметить, что влияние экспрессии Р-гр на цитотоксическое действие препарата зависит от тонких деталей его химического строения. Так, при исследовании действия идарубицина и доксорубицина на различные клеточные линии (человеческие и мышиные) с повышенной экспрессией Р-гр было показано, что первый препарат проявлял значимую активность, а второй – нет. Оба вещества относятся к группе антрациклинов; в их молекулах есть один и тот же углеводный компонент молекулы – даунозамин ( $pK_a = 8.4$ ). Атом азота в аминогруппе этого компонента протонирован и потому несет положительный заряд. Однако в силу деталей химической структуры идарубицин обладает большей липофильностью, чем доксорубицин (рис. 2), вследствие чего лучше проникает в клетку и в ней удерживается (Ma et al., 2009).

Как сказано выше, ингибирование белков-транспортеров в условиях *in vitro* повышает эффективность цитотоксического действия препаратов. Однако применение их в клинической практике осложняется тяжелыми побочными эф-





IDA:  $R_1 = H, R_2 = H$

DOX:  $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$

**Рис. 2.** Химическая структура идарубицина (IDA) и доксорубицина (DOX). Объяснение — в тексте (адаптирован по: Ma et al, 2009).

фектами ввиду интоксикации здоровых тканей (Callaghan et al., 2014).

### СИСТЕМА РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

Репарация ДНК — это процесс, в результате которого клетка обнаруживает и исправляет повреждения ДНК. Такие повреждения могут возникнуть в результате действия внешних (воздействие ультрафиолета, рентгеновских и  $\gamma$ -лучей, химиотерапевтических препаратов) и внутренних (гидролиз, окисление под действием АФК, алкилирование оснований в ДНК, появление неспаренных оснований) факторов. На клеточном уровне многочисленные повреждения ДНК могут приводить к возникновению генетической нестабильности, старению клеток и апоптозу. Вместе с тем это и одна из предпосылок к развитию онкологий. Механизмы репарации ДНК многочисленны, включая: 1) прямое восстановление; 2) репарацию неспаренных оснований; 3) эксцизию нуклеотидов; 4) эксцизию оснований; 5) гомологичную рекомбинацию (HR, homologous recombination); 6) негомологичное сращивание концов (NHEJ, non-homologous end joining) (Hakem, 2008; Zheng, 2017). Репарации предшествует активация генов системы ответа на повреждение ДНК (DDR, DNA damage response). DDR запускается с помощью молекулярного каскада, включающего фосфорилирование, поли-АДФ-рибозилирование, убиквитинилирование. При этом происходит координированная активация генов, контролирующая прохождение контрольных точек клеточного цикла, что приводит к замедлению или временной остановке деления. Эта задержка используется клеткой для репарации. Молекулы-сенсоры повреждений ДНК, собственно белки репарации, белки, участвующие в репликации

ДНК и в регуляции контрольных точек клеточного цикла образуют в клетках млекопитающих плотную сеть взаимодействий (Esposito, So, 2014).

Механизм действия многих противоопухолевых препаратов опирается на их генотоксическое действие, то есть способность индуцировать появление повреждений ДНК в быстро делящихся раковых клетках. В частности, это аналоги нуклеиновых оснований, алкилирующие препараты и цисплатин (группы I и II в таблице 1), а также ингибиторы топоизомераз (группа IV в таблице 1). Вызываемые ими повреждения приводят к возникновению генотоксического стресса при репликации ДНК и, как следствие, индукции апоптоза. Однако чувствительность раковых клеток к таким препаратам зависит от особенностей реализации в этих клетках механизмов ответа на повреждение.

Если в ДНК повреждена только одна цепь, то чаще всего запускается механизм репарации с эксцизией оснований (BER, base excision repair). В этом случае происходит замена оснований, поврежденных в результате действия АФК либо алкилирующих агентов. Механизм репарации с эксцизией нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair) позволяет удалить как поврежденные нуклеотиды, так и крупные аддукты, нарушающие геометрию спирали ДНК. Подобные дефекты могут появиться в результате действия УФ-лучей или химиотерапевтических агентов. Участвующий в этом механизме белок XPD, являющийся субъединицей TFIIH (transcription factor II Human), необходим для расплетения ДНК вблизи повреждения; кроме того, он стимулирует активность *p53*. У пожилых людей, гомозиготных по полиморфизму Lys751Gln в XPD (данная замена снижает функциональную активность белка), средняя 1-годовая выживаемость на фоне лекарственной терапии существенно ниже (23%) по сравнению с таковой для пациентов без данной замены (38%). Кроме того, гомозиготность по данной замене ассоциирована с повышенным риском развития вторичного ОМЛ при лечении онкологических заболеваний. Это указывает на вероятную повышенную устойчивость клеток ОМЛ с такой заменой к действию цитотоксических препаратов (Allan et al., 2004).

Двойные разрывы ДНК относятся к самым опасным повреждениям. Они образуются при действии ионизирующего излучения, химиотерапевтических агентов (например, ингибиторов топоизомеразы II), избыточного количества АФК. Разорванные участки молекулы могут быть неправильно соединены, в результате чего возникают инсерции и делеции. Двойные разрывы ДНК могут быть репарированы в результате репарации по пути HR или NHEJ. Оба процесса запускаются активацией одних и тех же белков — АТМ (ataxia-

teleangiectasia mutated, серин/треониновая протеинкиназа), DNA-PK (DNA-PK – ДНК-зависимая протеинкиназа), ATR (ATM and Rad3-related). Эти киназы фосфорилируют другие белки, принимающие участие в ответе на двунитевые разрывы ДНК и дальнейшей репарации (Long et al., 2017). HR происходит только в S- и G2-фазу клеточного цикла. Одним из ключевых белков, участвующих в этом процессе, является рекомбиназа RAD51. Гомологичная рекомбинация отличается большей точностью, но происходит только в делящихся клетках, так как для репарации в качестве матрицы нужна сестринская хроматида. Второй механизм – NHEJ – менее точный: в ходе NHEJ, как правило, образуются небольшие делеции или инсерции. Здесь ключевым является белковый комплекс ku70/ku80/DNA-PK (Esposito, So, 2014), активация которого не зависит от стадии клеточного цикла.

Рассмотрим, каким образом запускается ответ на повреждение ДНК при действии антиметаболита цитарабина. Этот химиотерапевтический агент является нуклеозидным аналогом: он включается в растущие цепи ДНК при репликации и препятствует их дальнейшему синтезу. В результате ДНК-полимеразы останавливаются, а хеликазы продолжают расплетать ДНК – образуются одноцепочечные участки молекулы. Это приводит к активации киназы ATR, которая запускает каскад фосфорилирования: активируется CHK1 (checkpoint kinase 1), которая, в свою очередь, фосфорилирует CDC25A (cell division cycle 25 homolog A или M-phase inducer phosphatase 1), что приводит к деградации этой фосфатазы и остановке клеточного цикла. Ингибирование CHK1 в лейкозных клетках с помощью селективного ингибитора GDC-0575 усиливает эффект цитарабина. Однако этот эффект наблюдается только в клеточных линиях, чувствительных к цитарабину; в случае резистентных линий он очень незначителен (Di Tullio et al., 2017). Таким образом, появление двойных разрывов ДНК вследствие действия препарата и их влияние на жизнеспособность клетки зависит от свойств конкретной клеточной линии. Данное положение подтверждают результаты исследования (Salunkhe et al., 2018), суть которого заключалась в обработке доксорубицином трех лейкозных линий: “ранней” резистентной, “поздней” резистентной и родительской. В клетках “поздней” линии двойные разрывы не были идентифицированы. Для клеток двух других линий, напротив, было показано наличие разрывов ДНК, но гибели только клетки родительской линии. Дальнейший анализ показал, что в клетках “ранней” линии повышена экспрессия гистон ацетилаз GCN5L2. Известно, что ацетилирование гистонов приводит к деконденсации хроматина; белок ATM в таком случае лучше взаимодействует с сайтами повреждения. По-

средством фосфорилирования он активирует гистон H2AX (эпигенетический маркер двуцепочечных разрывов хромосом), чекпойнт-киназу CHK2 и прочие белки каскада, запускает механизм репарации ДНК и, следовательно, способствует выживанию клеток. Отсутствие действия доксорубицина на клетки “поздней” линии исследователи объяснили снижением темпов поглощения ими препарата (Salunkhe et al., 2018).

Митоксантрон индуцирует более выраженную активацию включения в хроматин гистона H2AX, чем этопозид, поскольку повреждает ДНК как за счет интеркаляции, так и за счет усиления генерации АФК. Кроме того, исследования на клетках ОМЛ у детей показали, что митоксантрон (но не этопозид) способствует фосфорилированию DNA-PK и репарации двунитевых разрывов по механизму NHEJ. Ингибирование DNA-PK восстанавливало чувствительность резистентных лейкозных клеток к митоксантрону *in vitro* (Long et al., 2017). Одним из важных белков, принимающих участие в ответе на генотоксический стресс, оказалась инозитолполифосфат 4-фосфатаза II (INPP4B), обеспечивающая регуляцию фосфатидинозитол-опосредованного сигнального пути. Клетки линии ОМЛ KG-1 с повышенной экспрессией INPP4B при обработке цитарабином обладали повышенной жизнеспособностью по сравнению с клетками линии HL60, у которых уровень экспрессии INPP4B ниже. Кроме того, у первой упомянутой линии обнаружилось меньшее количество фосфорилированного гистона H2AX. Нокдаун экспрессии INPP4B в клетках KG-1 привел к увеличению количества фосфорилированного H2AX, что ассоциировалось с повышением чувствительности клеток этой линии к цитарабину (Wang et al., 2016).

## АБЕРРАНТНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Сплайсинг – это высокорегулируемый процесс формирования зрелой мРНК, кодирующей функциональный белок. В этот процесс вовлечено более двухсот различных молекул – факторов сплайсинга, которые способствуют сплайсингу или подавляют его в определенных точках. Вместе с малыми ядерными РНК факторы сплайсинга формируют комплекс, называемый сплайсосомой. Этот комплекс разрезает, а затем сшивает пре-мРНК в определенных участках. Наиболее известные факторы сплайсинга – это богатые серином белки (SR, serine-rich proteins), которые способствуют включению кассетных экзонов, и гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (hnRNP, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), которые обычно способствуют пропуску экзонов. Альтернативный сплайсинг – важная часть нормального гемопоэза: он играет роль в клеточной дифференцировке и быстрых ответах на

внешние воздействия. Мутации факторов сплайсинга отражаются на всем транскриптоме клетки, так как их следствием является изменение паттернов сплайсинга для множества генов. Если альтернативный сплайсинг затрагивает транслируемую область мРНК, то могут образовываться функционально отличающиеся (как правило, укороченные) изоформы белка, в то время как изменения в нетранслируемых участках отражаются на стабильности транскрипта и эффективности трансляции.

В процессе клональной эволюции лейкозных клеток мутации, вызывающие нарушение сплайсинга, могут повышать выживаемость опухолевых клеток за счет продукции антиапоптотических изоформ белков и снижения восприимчивости клеток к внутренним и внешним сигналам апоптоза. Особенно часто при онкологических заболеваниях крови, включая ОМЛ, детектируются мутации факторов сплайсинга SF3B1, SRSF2 и U2AF1, а также гиперэкспрессия фактора сплайсинга SRSF1 (De Necochea-Campion et al., 2016). Сложные изменения в паттернах альтернативного сплайсинга наблюдаются в ответ на нокдаун гибридного гена *RUNX1-RUNX1T1* (данный ген кодирует белок, функционирующий в роли транскрипционного фактора) в клеточных линиях ОМЛ и в первичных лейкозных клетках с транслокацией t(8:21). Это связано с изменением уровней экспрессии множества генов факторов сплайсинга, промоторы которых содержат мотивы для связывания продукта гибридного гена, и также с изменением частоты использования альтернативных промоторов генов при их транскрипции (Grinev et al., 2021).

Многие мутации в генах белков сплайсосом находятся в клетке в гетерозиготном состоянии. Это означает, что гомозиготность по какой-либо из них может быть летальна; не исключен и доминантный негативный эффект (Makishima et al., 2012). В целом при ОМЛ мутации в генах сплайсосомных белков встречаются реже, чем при миелодиспластическом синдроме (de Necochea-Campion et al., 2016).

Альтернативный сплайсинг может влиять на лекарственную устойчивость посредством контроля относительной продукции проапоптотических и антиапоптотических изоформ некоторых белков-регуляторов. В частности, антагонистическая активность показана для белковых продуктов генов *BAX*, *BIM*, *CASP9*, *c-FLIP* и ряда других.

Существует два основных механизма реализации апоптоза, которые отличаются способами индукции и спецификой сигнальных путей. Путь, запускаемый извне (extrinsic apoptosis), регулируется за счет “рецепторов смерти” на поверхности клеточной мембраны. Это белки из семейства рецепторов факторов некроза опухолей (TNF, tu-

mor necrosis factor), такие как FAS (first apoptosis signal receptor) и TRAIL-R1 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1). После связывания с лигандом цитозольный белок-адаптор FADD (Fas-associated death domain) активирует прокаспазу-8, и та инициирует процесс формирования сигнального комплекса, запускающего клеточную гибель (DISC, death-inducing signaling complex). В этом комплексе прокаспазы-8 (CASP8) становится активной и активирует иные проапоптотические молекулы, в частности, другие каспазы. Этот путь может подавляться антиапоптотическими белками на уровне взаимодействия лиганда с рецептором или передачи сигнала от рецептора внутри клетки.

Второй механизм инициации апоптоза (intrinsic apoptosis) зависит от внутриклеточных сигналов стресса (повреждение ДНК является одним из таких сигналов), которые индуцируют повышение проницаемости митохондриальной мембраны, что приводит к активации CASP9. Проницаемость митохондриальной мембраны в основном контролируется белками семейства Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Альтернативные изоформы этих белков обладают про- и антиапоптотическими свойствами. Показано, что повышенная экспрессия антиапоптотических белков этого семейства делает клетки устойчивыми к разным воздействиям, притом запуск того или иного белкового каскада отличается в зависимости от используемого терапевтического агента. Такой фактор сплайсинга, как SRSF1 (serine-rich splicing factor 1) способствует образованию изоформ Bcl-2-подобного белка 11 (BIM), лишенных проапоптотической активности. Было установлено, что гиперэкспрессия SRSF1 связана с активацией комплекса mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), связанного с прогрессией ОМЛ и клональным отбором во время воспроизводства клеток при рецидивах после ремиссии. Повышение экспрессии изоформ белков, действующих в роли ингибиторов каспазной активности, ассоциировано с возникновением лекарственной резистентности многих новообразований, в том числе ОМЛ (de Necochea-Campion et al., 2016).

Для гена каспазы CASP9 два установленных альтернативных продукта сплайсинга *CASP9a* и *CASP9b* отличаются наличием/отсутствием каскасы из четырех экзонов: первая изоформа проапоптотическая, а вторая – антиапоптотическая. Повышение относительного уровня экспрессии изоформы CASP9b выявляется в устойчивых к лекарствам клетках ОМЛ с повышенной активностью сигнального пути АКТ (de Necochea-Campion et al., 2016).

Интересно, что в свою очередь сама гиперактивация АКТ-пути в клетках ОМЛ в большой доле случаев бывает обусловлена продукцией аль-

тернативных изоформ рецепторной тирозинкиназы FLT3 — в результате альтернативного сплайсинга формируются конститутивно активные формы белка, работающие в отсутствие лиганда для этого рецептора. Избыточное образование таких изоформ выявляется в 25% случаев ОМЛ (de Necochea-Campion et al., 2016).

Даже одна и та же изоформа белка может проявлять разные свойства в зависимости от условий. Так, белок с-FLIP существует в виде нескольких антиапоптотических изоформ — двух коротких (с-FLIP<sub>S</sub>) и длинной (с-FLIP<sub>L</sub>). Результаты анализа экспрессии мРНК у взрослых, больных ОМЛ, показали, что у пациентов с повышенным уровнем экспрессии длинной изоформы (но не короткой) трехлетняя выживаемость была значительно ниже, чем у пациентов с низкой экспрессией ( $p = 0.04$ ). Однако подавление обоих транскриптов с помощью siРНК (малой интерферирующей РНК) вызывало индукцию апоптоза либо повышение чувствительности к рекомбинантному TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) в зависимости от клеточной линии (McLornan et al., 2012). Было обнаружено, что длинная изоформа с-FLIP подавляет апоптоз при экспрессии в больших концентрациях, а в малых, напротив, способствует активации каспазы CASP8, тем самым индуцируя апоптоз (De Necochea-Campion et al., 2016). Экспрессия с-FLIP может быть подавлена малыми молекулами с разными механизмами действия, например, тритерпеноидами или протеасомным ингибитором бортезомибом, но все они обладают плейотропным действием, что служит препятствием для использования этих ингибиторов в терапии в связи со значительными побочными эффектами (McLornan et al., 2012).

Ответ на терапевтическое воздействие определяется количественным соотношением про- и антиапоптотических изоформ. Такой белок, как сурвивин, подавляет апоптоз, стабилизируя некоторые антиапоптотические белки и блокируя проапоптотические. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию пяти изоформ сурвивина, различающихся по способности взаимодействовать с другими белками. Различные изоформы сурвивина имеют свои паттерны компартиментализации в клетке, которые могут меняться в процессе химиотерапии (De Necochea-Campion et al., 2016).

Мы привели здесь лишь небольшую часть известных случаев ассоциации альтернативного сплайсинга с лекарственной устойчивостью при ОМЛ. Более полно этот вопрос рассмотрен в специальном обзоре (de Necochea-Campion et al., 2016).

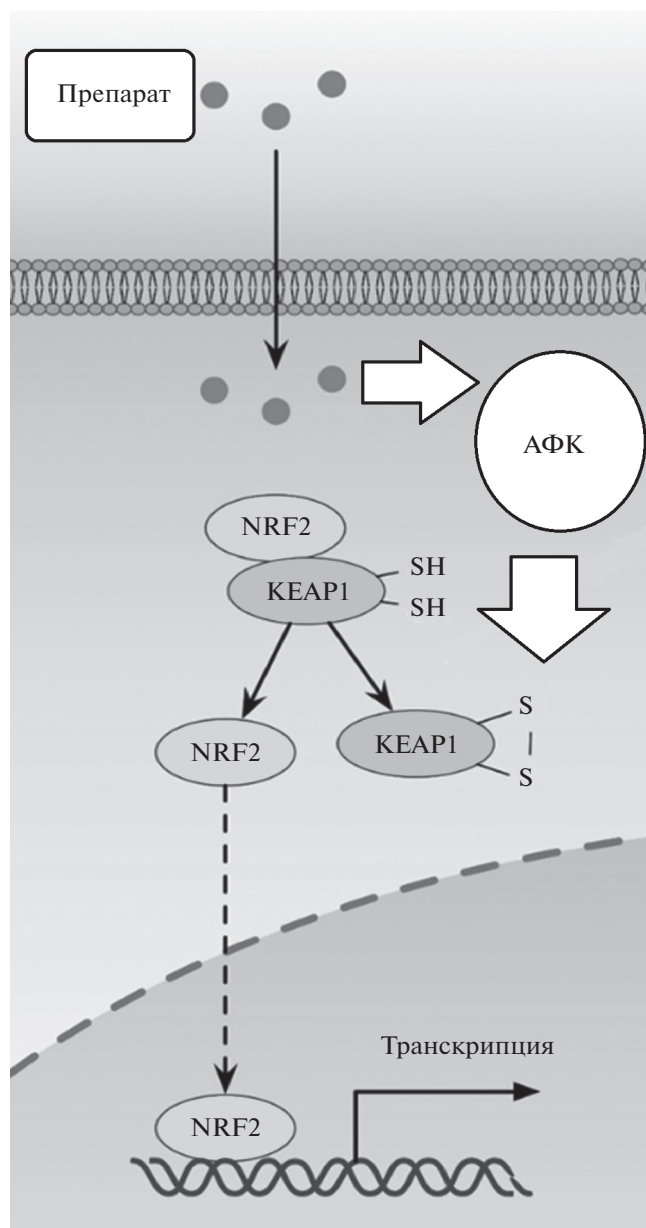
Тем не менее, не все мутации сплайсосомных компонентов связаны с плохим прогнозом. В частности, мутации SF3B1 (splicing factor 3B subunit 1) при миелодиспластическом синдроме

ассоциированы с невысоким риском развития ОМЛ (Makishima et al., 2012).

### ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА

Нормальные клетки способны поддерживать баланс между оксидантами и антиоксидантами. Оксиданты — АФК, такие как пероксид водорода, гидроксильный радикал, супероксид и синглетный кислород, в субмикромольных концентрациях действуют как вторичные посредники при регуляции пролиферации, клеточной гибели и других процессах в клетке. Избыточный уровень АФК индуцирует окислительный стресс, который может привести к старению клеток здоровых тканей или к их злокачественному перерождению. Экстремально высокий уровень АФК приводит к гибели клеток. Замечено, что многие антинеопластические препараты (паклитаксел, цисплатин и др.) вызывают повышение внутриклеточной концентрации АФК, что может являться одним из важных аспектов их цитотоксического действия (Pavlov et al., 2017; Kalinina et al., 2018). Однако в процессе химиотерапии в некоторых клетках опухоли может установиться новый окислительно-восстановительный баланс. Суть этого явления состоит в том, что, с одной стороны, аккумулируется все больше АФК, с другой — усиливается работа антиоксидантной системы. В результате клетки новообразования приобретают устойчивость к препаратам (Liu et al., 2016b).

Описано возникновение резистентности при ОМЛ, опосредованное гиперэкспрессией транскрипционного фактора NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2). NRF2 — это главный регулятор антиоксидантного ответа, который играет роль также и в развитии лекарственной устойчивости солидных опухолей. Он связывается с так называемыми “элементами антиоксидантного ответа” (ARE, antioxidant response elements) в ДНК и контролирует активность широкого спектра генов, вовлеченных в установление окислительно-восстановительного баланса, синтез глутатиона и детоксикацию лекарственных препаратов. ARE расположены также в промоторных областях генов интегральных транспортных белков. NRF2 постоянно заякорен в цитоплазме с помощью белка KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); KEAP1 способствует убиквитинилированию NRF2 и его дальнейшей протеасомной деградации. При нарушении окислительно-восстановительного баланса в клетке цистеиновые остатки белка KEAP1 в положениях 273 и 288 окисляются, что приводит к освобождению NRF2, его транслокации в ядро и активации генов-мишеней (рис. 3) (Liu et al., 2016b). Гиперэкспрессия NRF2 в общем случае происходит по причине мутаций



**Рис. 3.** Активация NRF2 при действии препарата, вызывающего продукцию АФК. Объяснение — в тексте (адаптирован по: Liu et al., 2016b).

или aberrантной посттрансляционной модификации белка KEAP1, активации транскрипции онкогенным Ras или с-МYC либо — уже на уровне белкового продукта гена — благодаря фосфорилированию его по остаткам серина, тирозина или треонина, которое защищает этот белок от убиквитинирования. В исследовании (Karathedath et al., 2017) было показано, что в образцах первичного ОМЛ с высокими значениями  $IC_{50}$  *ex vivo* для цитарабина и даунорубина значительно повышено содержание РНК гена *NRF2*. Нокдаун гена, как и обработка ингибитором NRF2 брусатолом

увеличили чувствительность клеток к вышеупомянутым препаратам, а также снизили их способность к формированию колоний. Важно отметить, что в отличие от солидных опухолей экспрессия *NRF2* в ОМЛ не зависела от активности пути PI3K/AKT (Karathedath et al., 2017).

### АКТИВАЦИЯ ПРООНКОГЕНОВ

Во многих случаях при первичных ОМЛ выявляется конститутивная активация пути PI3K/AKT в лейкозных клетках (Martelli et al., 2007). Он регулирует выживаемость и химиорезистентность клеток посредством активации антиапоптотического белка NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) и подавления опухолевого супрессора p53. PI3K (фосфатидил инозитол-3 киназа) относится к семейству киназ, играющих ключевую роль в пролиферации и выживании клеток. AKT является серин/треонин-специфичной протеинкиназой, которая также вовлечена в процессы транскрипции, апоптоза, пролиферации и миграции клеток. Мишеней у этой киназы множество (Grandage et al., 2005). Так, фосфорилирование 136-й аминокислоты (серина) в белке BAD (Bcl-2-associated death promoter) этой киназой ведет к диссоциации его комплекса с Bcl-2/Bcl-X и подавлению функции BAD как индуктора апоптоза (Zheng, 2017). AKT активируется фосфорилированием 308-го треонина и 473-го серина. Конститутивное фосфорилирование AKT связано с меньшей общей выживаемостью пациентов с ОМЛ. Инкубация клеток с селективным ингибитором PI3K, LY294002, снижает или устраняет фосфорилирование AKT. При этом наблюдается повышение цитотоксического эффекта цитарабина, винкристина, доксорубина, трастузумаба, этопозида. Активация же AKT с использованием системы, индуцируемой с помощью тамоксифена, напротив, вела к существенному снижению числа погибших клеток при инкубации с цитарабином либо этопозидом (Grandage et al., 2005).

ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) — широко экспрессируемые протеинкиназы, регулирующие митоз, мейоз и постмитотические функции при стимуляции факторами роста, цитокинами, вирусами и лигандами рецепторов, связанных с G-белками (Zheng, 2017). Они активируются за счет пути Ras/Raf/MEK/ERK (MEK, mitogen-activated protein kinase kinase). Активация этого сигнального пути наблюдается в трети случаев онкологий, в том числе в более 50% ОМЛ. Есть свидетельства, что путь MEK1/2-ERK1/2 способствует появлению резистентности клеток ОМЛ у детей *in vitro* к митоксантрону и этопозиду (Long et al., 2017). Белки ERK активируют многие факторы транскрипции, например ELK1 (ETS domain-containing protein), и другие протеинки-



назы, которые связаны с пролиферацией клеток, апоптозом и развитием лекарственной устойчивости (Zheng, 2017). Показано, что селуметиниб ингибирует MEK1/2, вследствие чего экспрессия ERK1/2, индуцированная стромальными клетками, возвращается на прежний уровень. Следует отметить, что установившие этот факт исследователи сообщают, что, хотя и наблюдалась некоторая корреляция между повышенным уровнем pERK1/2 (фосфорилированной ERK1/2), индуцированного стромальными клетками линии HS27A, и плохим прогнозом у пациентов, от которых были взяты соответствующие образцы лейкозных клеток, она не была признана статистически значимой (как отмечают авторы, возможной причиной была небольшая величина выборки) (Long et al., 2017).

В процессе клональной эволюции ОМЛ во многих случаях возникают мутации рецепторной тирозин киназы FLT3, оказывающей активирующее действие на пути PI3K/AKT и RAS/MEK. Особенно распространены дупликации в трансмембранном домене (FLT3-ITD). Эти мутации обуславливают конститутивную активность белка в отсутствие лиганда и ассоциированы с плохим прогнозом при лечении лейкоза. Для ингибирования активности мутантной формы белка было разработано несколько вариантов ингибиторов. В частности, комбинированное применение ингибитора FLT3 сунитиниба со стандартными препаратами позволило улучшить клинический эффект у пациентов (Daver et al., 2019).

NF-κB является транскрипционным фактором, повышенная активность которого связана с антиапоптотическими эффектами. Он является конститутивно активным в ряде онкологий, включая ОМЛ (Grandage et al., 2005). В нестимулированных клетках димеры NF-κB связаны в цитоплазме с ингибиторным белком IκBα и потому неактивны. Активация NF-κB наступает вследствие фосфорилирования, полиубиквитинирования и протеасомной деградации IκBα. Индуцируют активность NF-κB различные факторы: АФК, TNFα, интерлейкин-1β, ионизирующее излучение, химические реагенты. Активный NF-κB перемещается в ядро клетки и повышает уровни транскрипции антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-XL, сурвивина, XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (Zheng, 2017). Поскольку NF-κB также активируется посредством пути PI3K/AKT, ингибирование PI3K ведет к уменьшению активности этого фактора транскрипции, а как следствие, и повышению чувствительности к противолейкозным препаратам. В эксперименте с использованием первичных культур ОМЛ это привело к значительному уменьшению конститутивной активности NF-κB в 9 из 10 образцов от разных пациентов. Значение активности составило  $34 \pm 7\%$  от контрольного (Grandage et al., 2005).

Известно, что конститутивная активность NF-κB в клетках ОМЛ отчасти бывает связана с усилением функциональной активности протеасом, которые, как уже было сказано, обеспечивают деградацию белка-ингибитора IκBα. На данный момент разработаны протеасомные ингибиторы, которые позволяют опосредованно снизить уровень активного NF-κB. Так, карфилзомиб и опрозомиб необратимо связываются с β5-субъединицей иммунопротеасомы, что позволяет пролонгированно инактивировать деградацию IκBα. В экспериментах *in vitro* карфилзомиб индуцирует апоптоз бластов ОМЛ; что же касается клинической активности, то она наблюдалась у пациентов с множественной миеломой, которым не помогал бортезомиб – протеасомный ингибитор первого поколения; побочные эффекты также были менее серьезными (Bosman et al., 2016).

## ИНАКТИВАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ СУПРЕССОРОВ

Одним из ключевых и универсальных медиаторов клеточного ответа на повреждения ДНК и другие стрессовые воздействия является белок p53.

Белок p53 активирует гены, связанные с репарацией ДНК и апоптозом, индуцированным как внешними сигналами, так и внутренними. К известным проапоптотическим генам, которые активируются p53, относятся *PUMA* (p53 upregulated modulator of apoptosis), *NOXA*, *BAX* (Bcl-2-associated X protein). Проапоптотические белки образуют олигомеры, формирующие поры в мембране митохондрий, в результате чего запускается каспазный каскад (Tan et al., 2014). Кроме того, p53 является ингибитором аутофагии (Prokocimer, Peller, 2012). Гены, транскриптивируемые p53, индуцируют остановку клеточного цикла и запуск апоптоза (Grandage et al., 2005).

Мутации гена *TP53* встречаются примерно в половине случаев злокачественных новообразований. Вместе с тем, при ОМЛ *de novo* такие мутации встречаются нечасто (в 5–15% случаев) (Grandage et al., 2005). Гораздо более характерны мутации *TP53* для случаев ОМЛ с комплексным aberrантным кариотипом (78%) (Prokocimer, Peller, 2012).

Следует заметить, что причиной резистентности может стать и аномальный экспорт белка p53 из ядра даже при нормальном уровне его экспрессии. Так, у 67-летнего больного ОМЛ, лечение которого по классической схеме было безуспешным, тем не менее выявлялась высокая концентрация p53, находящегося, однако, преимущественно в цитоплазме миелобластов (Prokocimer, Peller, 2012).

Относительно небольшая частота встречаемости мутаций *TP53* у пациентов с ОМЛ предпола-

гает, что продукт данного гена малоактивен в этих случаях по другим причинам. В частности, предполагается, что пониженная чувствительность раковых клеток, в том числе при ОМЛ, к химиопрепаратам может быть обусловлена гиперэкспрессией генов *MDM2* и/или *MDM4*.

Белки *MDM2* (mouse double minute 2 homolog) и *MDM4* являются антагонистами белка *p53*. Белок *Mdm2* представляет собой убиквитин лигазу. Связываясь с *p53*, он убиквитинирует его и способствует последующей деградации посредством протеасом. *Mdm4* не обладает убиквитинлигазной активностью, однако, как и *Mdm2*, способен подавлять активность *p53*, связываясь с его трансактиваторным доменом; кроме того, он стимулирует убиквитинлигазную активность *Mdm2*. *Mdm2* также способствует экспорту *p53* из ядра. В норме белки семейства *MDM2* обеспечивают поддержание постоянной умеренной активности *p53* в нормальных клетках. При возникновении повреждений ДНК и стрессовых воздействиях на клетку происходит активация серин/треонин киназы *ATM*, которая фосфорилирует *p53*, что приводит к его отсоединению от белков семейства *Mdm*, а также стабилизации его конформации.

Обработка клеточных линий ОМЛ препаратом нутлин-3 — специфическим ингибитором *MDM2* — обеспечивало увеличение времени жизни молекул белка *p53* и повышало частоту апоптоза (Kojima et al., 2005). Был продемонстрирован синергизм цитотоксического действия в отношении первичных клеток и клеточных линий ОМЛ нутлина-3 с ингибитором белка теплового шока *HSP90*, гелданамицином (Haaland et al., 2014). Нутлин-3 оказался также эффективен *in vivo* при применении совместно с другими препаратами, например, с вальпроевой кислотой, ингибитором гистондеацетилазы. В опытах на мышах с подкожно трансплантированными клетками ОМЛ человека линии *MOLM-13*, экспрессирующими люциферазу, введение животным данной комбинации препаратов вызвало значительное подавление прогрессирования ОМЛ (McCormack et al., 2012).

Исследование (Tan et al., 2014) также показало повышение активности *p53* и снижение жизнеспособности клеточных линий ОМЛ с гиперэкспрессией *MDM2* (*AML1* и *AML3*) при воздействии препарата нутлин-3. Такого эффекта, однако, не наблюдалось в клеточной линии *AML2* с гиперэкспрессией гена *MDM4*. Вместе с тем, нокдаун *MDM4* при помощи РНК-интерференции в клетках этой линии привел к падению их жизнеспособности при одновременном повышении активности *p53* (Tan et al., 2014).

Активировать *p53* для преодоления лекарственной устойчивости можно с помощью гипометилирующих агентов непосредственно перед основным курсом терапии. Известно, что в случа-

ях ОМЛ с высоким риском наблюдается частое и обратимое локальное метилирование ДНК и подавление экспрессии генов, участвующих в контроле клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Снижение метилирования, напротив, ведет к активации генов. Одним из таких гипометилирующих агентов является децитабин. Было продемонстрировано, что децитабин увеличивал цитотоксический эффект цитарабина и адриамицина у резистентной линии *Kasumi-1* за счет активации *p53* и опосредованного его активностью снижения экспрессии сурвивина и *Bcl-2* (Jiang et al., 2015).

Еще один путь повышения активности *p53* — применение ингибиторов сигнального пути *PI3K/AKT*, который активирует множество антиапоптотических генов, включая, в частности, *MDM2* и *MDM4*. В ранее упомянутом исследовании (Grandage et al., 2005) после подавления *PI3K* ингибитором *LY294002* у четырех из девяти пациентов произошло более чем двукратное увеличение активности *p53*.

## АУТОФАГИЯ

Аутофагия — это процесс, суть которого заключается в деградации и реутилизации белковых агрегатов и поврежденных органелл клетки. Поскольку он связан с самообновлением клеток и их активной пролиферацией, он является неотъемлемой частью нормального гемопоэза (Chen et al., 2017). С другой стороны, аутофагия запускается в ответ на разнообразные стрессовые воздействия. В результате формируются аутофагосомы, в которых также помимо органелл подвергаются переработке аминокислоты и жирные кислоты (Zheng, 2017).

*Beclin-1*, входящий в семейство гомологов *Bcl-2*, — один из ключевых белков, участвующих в процессе аутофагии. Вместе с другими белками он формирует опорный комплекс для образования и роста аутофагосомы. Фосфорилирование и убиквитинилирование белка *Beclin-1* обеспечивает активацию аутофагии за счет стабилизации аутофагосомных белковых комплексов. *Toll*-подобный рецептор 4 (*TLR4*) убиквитинирует *Beclin-1* по остатку лизина 63 в ответ на активацию рецептора *TNF*. *NF-κB* активирует экспрессию гена *Beclin-1* на уровне транскрипции, в то время как *miR30a* является негативным регулятором экспрессии данного гена. Помимо *Beclin-1* в процессе аутофагии задействовано несколько десятков белков, которые объединяют в группу *ATG* (autophagy-related genes), также регулируемые на уровне транскрипции, трансляции и посттрансляционной модификации (Zheng, 2017).

Интересным оказался тот факт, что каспазы — белки, ответственные, как известно, за реализа-



цию программы апоптоза, также оказались способны регулировать аутофагию, причем характер регуляции двойственный: каспазы могут непосредственно связывать и расщеплять Beclin-1, подавляя его работу, и вместе с тем осуществлять активацию этого же белка через опосредованные механизмы (Zheng, 2017). Было также обнаружено, что Beclin-1 может формировать комплексы с антиапоптотическим белком Bcl-2 (Marquez, Xu, 2012). Множественные сложные взаимодействия между компонентами системы апоптоза и аутофагии являются причиной ее двойственной роли: в одних случаях аутофагия повышает выживание клеток, в других, напротив, направляет клетку к программируемой смерти (Yonekawa, Thorburn, 2013). Этим, вероятно, объясняется неоднозначная роль аутофагии в развитии онкологических заболеваний, включая ОМЛ. Достаточно часто ранние лейкозные клоны несут мутации, снижающие активность компонентов системы аутофагии (Djavaheeri-Mergny et al., 2019).

Вместе с тем, в ответ на воздействие химиотерапевтических препаратов в лейкозных клетках, как правило, отмечается усиление аутофагии, которое играет цитопротекторную роль. Метаболиты из аутофаголизосом вовлекаются в синтетические процессы, необходимые для регенерации клетки (Watson et al., 2015; Piya et al., 2016). Кроме того, в ходе клональной эволюции на фоне терапии нередко могут появляться мутации, способствующие дополнительному усилению аутофагии (Djavaheeri-Mergny et al., 2019). Эти наблюдения приводят к предположению, что эффективность противолейкозного действия химиотерапевтических препаратов можно повысить, используя одновременное подавление системы аутофагии.

В настоящее время на разных стадиях испытаний находятся несколько типов веществ, действующих как ингибиторы аутофагии, в частности, бафиломицин А1, хлорокин и гидроксихлорокин, 3-метиладенин, ROC-325. Следует заметить, что эффекты всех этих соединений достаточно разнообразны, и не ограничиваются влиянием на аутофагию, что осложняет интерпретацию получаемых результатов (Chen et al., 2017). К более специфичным ингибиторам относятся спаутин-1 (селективный ингибитор деубиквитиназы USP10/13), SBI-0206965 (ингибитор киназы ULK1), PIC-III, SAR405 — ингибиторы киназы VPS34, обеспечивающей инициацию аутофагии. Также для изучения роли аутофагии в химиорезистентности ряд авторов использовали метод РНК-интерференции.

Бафиломицин А1 действует как селективный ингибитор вакуолярной протонной АТФазы, которая обеспечивает снижение рН среды лизосом. Хлорокин же блокирует слияние аутофагосом с лизосомами. Сочетание цитотоксического пре-

парата доцетаксела или цитарабина с ингибитором аутофагии существенно повысило частоту апоптоза клеток ОМЛ по сравнению с обработкой только препаратом в экспериментах *in vitro* (Hanekamp et al., 2014). Аналогичный эффект был показан для статинов (вещества, подавляющие синтез холестерина) и рекомбинантной аргиназы человека (Auberger, Puissant, 2017).

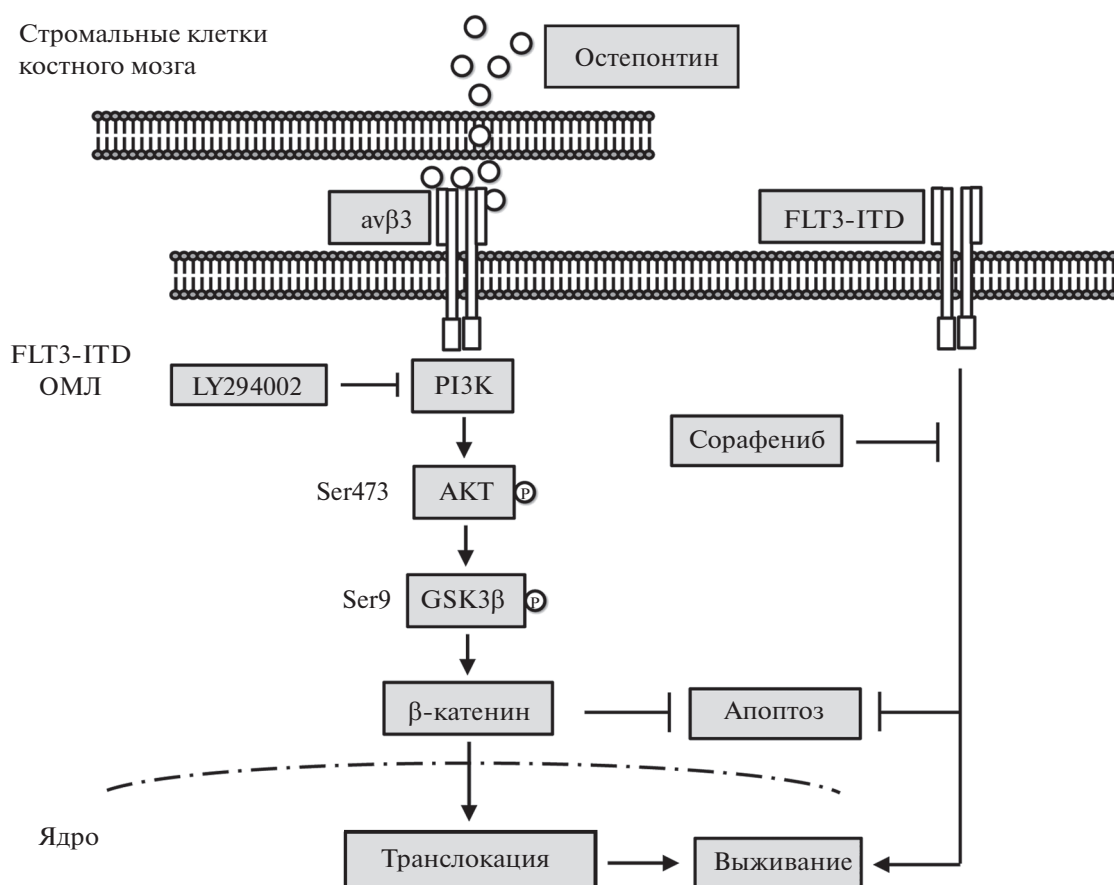
В исследовании (Qiu et al., 2020) было показано, что ингибирование серин/треониновой киназы ULK1 (UNC51-like kinase 1) с помощью высоко-селективного ингибитора SBI-0206965 или нокадаун гена с помощью малых шпилечных РНК приводили к повышению цитотоксичности даунорубицина для лейкозных клеток *in vitro*. Данная киназа играет ключевую роль в инициации процесса аутофагии (Zachari, Ganley, 2017).

Следует отметить, что пока нет клинических испытаний, в которых была бы доказана повышенная эффективность терапии пациентов ОМЛ комбинациями стандартных цитотоксических препаратов с ингибиторами аутофагии. Однако в качестве самостоятельного препарата без выраженных побочных эффектов был успешно испытан ROC-325 (Nawrocki et al., 2016).

## ИНТЕГРИНЫ

Интегрины составляют семейство рецепторов клеточной адгезии с множеством функций, которые встречаются у всех многоклеточных животных. Они участвуют в прикреплении клеток друг к другу и к молекулам внеклеточного матрикса, играют ключевую роль в развитии организма и иммунном ответе, движении лейкоцитов (Hynes, 2002).

Известно, что интегрины вносят вклад в инвазивность опухолей и метастазирование. Роль интегринов в развитии резистентности ОМЛ еще не до конца прояснена. Тем не менее, известно, что связывание лейкозных клеток с внеклеточным матриксом костного мозга через интегрины  $\beta 3$  может влиять на выживаемость клеток при лечении. В исследовании (Yi et al., 2016) было показано, что при совместном культивировании клеток линии MV4-11 с мутацией FLT-ITD (внутренние tandemные дубликации в Fms-подобной тирозинкиназе) и стромальных клеток костного мозга более высокая экспрессия интегрин  $\alpha \beta 3$  ассоциирована с пониженной чувствительностью первых к ингибитору протеинкиназ сорафенибу. Данный интегрин после связывания остеопонтина, внеклеточного структурного белка, стимулирует активацию  $\beta$ -катенина за счет пути PI3K/AKT/GSK3 (рис. 4). Активированный  $\beta$ -катенин поступает в ядро клетки и работает в качестве кофактора в системе регуляции транскрипции генов. Если  $\beta$ -катенин подавляли с помощью ма-



**Рис. 4.** Схема индукции остеопонтином, вырабатываемым клетками стромы костного мозга, пути интегрин  $\alpha v\beta 3$ /PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ /β-катенин в лейкозных клетках с мутацией FLT3-ITD (адаптирован по: Yi et al., 2016).

лых шпилечных РНК, чувствительность линии MV4-11 к сорафенибу повышалась (Yi et al., 2016).

### РОЛЬ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК

МикроРНК — это некодирующие двуцепочечные РНК длиной 18–24 п.н., участвующие в регуляции экспрессии белок кодирующих генов по механизму РНК интерференции, вызывая деградацию транскриптов или блокируя трансляцию. Изменение (снижение или повышение) уровней экспрессии микроРНК, играющих роль в нормальном развитии клеток, контролируя клеточный цикл и дифференцировку, во многих случаях способствует развитию и прогрессированию гематологических онкологий, включая ОМЛ (Liao et al., 2017). Регулируя экспрессию генов, участвующих в индукции и реализации апоптоза или ассоциированных с другими механизмами резистентности к препаратам (включая все рассмотренные выше), микроРНК могут обуславливать и возникновение лекарственной устойчивости у клеток ОМЛ (Gabra, Salmena, 2017).

В частности, в линиях ОМЛ, резистентных к цитарабину, оказалась изменена экспрессия

*miR-181a*. Интересно, что, хотя содержание этой микроРНК было более высоким в лейкозных клетках, чем в нормальных гемопоэтических предшественниках, уровень ее экспрессии положительно коррелирует с чувствительностью клеток к цитотоксическим препаратам как *in vitro*, так и *in vivo* при лечении пациентов (Schwind et al., 2010). Среди мишеней этой микроРНК — ген белка АТМ, участвующего в инициации реакции на повреждение ДНК и репарации, а также гены семейства Bcl-2 (Liu et al., 2016a). Также в резистентных линиях была выявлена пониженная экспрессия *miR-128*, мишенью которой служит важный компонент системы репарации разрывов ДНК Rad51. Повышенная экспрессия *miR-34a* обуславливает резистентность благодаря подавлению экспрессии белка p53. Выявлено несколько микроРНК, мишенями которых являются гены транспортных белков ABC-семейства, в частности *miR-27a* и *miR-331-5p*. Лекарственная устойчивость ассоциировалась со сниженной экспрессией этих молекул в клетках ОМЛ (Feng et al., 2011). Также было продемонстрировано снижение чувствительности к действию лекарств при сниженной экспрессии микроРНК *let-7a*, кото-

рая коррелировала с повышенной экспрессией антиапоптотических генов *C-MYC* и *BCL-XL*. При этом снижению *let-7a* способствовала активация хемокинового рецептора CXCR4 (Chen et al., 2013). Интересной представляется перспектива использования искусственных микроРНК (или их аналогов) для комбинированной терапии в целях повышения чувствительности малигнизированных клеток к химическим препаратам, однако пока это направление слабо разработано (Gabra, Salmena, 2017).

Также было продемонстрировано и значение уровней экспрессии некоторых длинных некодирующих РНК в формировании лекарственной резистентности при острых лейкозах, в частности *UCA1*, *MALAT1*, *NEAT1*, *HOXA-AS2* и др. Как минимум некоторые из них оказывают свое влияние на чувствительность клеток к индукции апоптоза благодаря функционированию в качестве “губок” для микроРНК (Wong et al., 2018; Cruz-Miranda et al., 2019; Liu et al., 2019).

#### КЛЕТКИ СТРОМЫ И МИКРООКРУЖЕНИЕ

Для роста и дифференцировки многих гемопоэтических клеток, как уже было сказано ранее, необходимо, чтобы они напрямую контактировали с клетками стромы. Лейкозные клетки происходят от нормальных бластных клеток и занимают те же ниши. Поэтому при изучении возникновения резистентности ОМЛ важно принимать во внимание взаимоотношения между бластами и клетками стромы. После проведения курса терапии рецидив может произойти по причине того, что некоторое количество лейкозных клеток оказалось защищенным от действия препаратов благодаря клеткам стромы (Konopleva et al., 2002).

На данный момент имеются подтверждения тому, что клетки стромы способствуют выживанию клеток ОМЛ, активируя соответствующие сигнальные пути (такие, как ERK1/2, STAT3 и STAT5 (signal transducer and activator of transcription)) за счет контактных взаимодействий и/или секреции определенных растворимых факторов (в зависимости от режима химиотерапии). К таким растворимым соединениям относятся факторы роста и цитокины (Long et al., 2017). Цитокины играют значительную роль в регуляции пролиферации клеток ОМЛ, их выживании и апоптозе. Такой цитокин, как SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), принадлежит к семейству цитокинов СХС и вырабатывается линией стромальных клеток MS-5. Данный цитокин и его рецептор CXCR4 — ключевые компоненты процесса хоуминга нормальными стволовыми клетками костномозгового микроокружения. Они же способствуют миграции предшественников ОМЛ к

клеткам стромы и их взаимодействию с мембранно-связанными цитокинами (Konopleva et al., 2002).

В исследовании (Long et al., 2017) был изучен ответ первичных культур, полученных от детей с ОМЛ, на митоксантрон и этопозид — ингибиторы топоизомеразы II. Оценку проводили в условиях культивирования со стромальными клетками или без них. Выяснилось, что чувствительность к препаратам зависела от уровня активации в клетках системы ответа на повреждения ДНК. В присутствии стромальных клеток клетки ОМЛ становились значительно менее чувствительными к цитотоксическому действию препаратов, при этом в клетках ОМЛ наблюдалась повышенная активность преимущественно ERK1/2-сигнального каскада. Добавление селуметиниба, селективного ингибитора ERK1/2, снижало индуцированную стромальными клетками линии HS27A лекарственную устойчивость. Однако при культивировании клеток ОМЛ вместе с другой линией стромальных клеток, HS5, обработка селуметинибом не повлияла на чувствительность их к тем же препаратам. Это позволяет предположить, что клетки HS5, выделяя большее количество растворимых факторов, активируют не один, а множество сигнальных антиапоптотических путей (Long et al., 2017).

Также было показано и защитное действие клеток стромы у взрослых пациентов. В исследовании (Macanas-Pirard et al., 2017) у пациентов с ОМЛ, которым назначили терапию с применением цитарабина, брали стромальные клетки костного мозга и следили за тем, коррелирует ли выживаемость лейкозных линий, также подвергнутых действию цитарабина и обрабатываемых супернатантом стромальных клеток, с ухудшением прогноза. Было выяснено, что у тех пациентов, для которых *in vitro* IC<sub>50</sub> цитарабина выросла более чем в два раза, двухлетняя выживаемость была значительно ниже, чем у пациентов, для которых резистентность к цитарабину не была выявлена (0 и 80% соответственно) (Macanas-Pirard et al., 2017).

#### ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

Экзосомы и другие типы внеклеточных везикул, производимые раковыми клетками, а также ассоциированными с опухолью фибробластами или мезенхимальными стволовыми клетками, могут включать в себя самые разные молекулы, включая белки и нуклеиновые кислоты. Взаимодействуя с клетками-реципиентами или проникая внутрь клеток посредством фагоцитоза, они способны регулировать множество сигнальных путей. Они могут быть связаны с ростом опухоли, ее развитием, метастазированием, ангиогенезом, а также с подготовкой преметастатической ниши за счет создания благоприятного микроокружения

и подавления противоопухолевых реакций иммунной системы. Имеются данные и о роли экзосом в развитии резистентности к химиопрепаратам. По этим причинам экзосомы можно использовать как маркеры для прогноза и подбора подходящего курса терапии (Maacha et al., 2019).

В нескольких недавних исследованиях было установлено, что экзосомы из устойчивых к апоптозу бластов первичного ОМЛ могут повышать резистентность у контактирующих с ними чувствительных клеток ОМЛ. Эти эффекты могут быть опосредованы белками, среди которых значительная доля приходится на факторы сплайсинга и эпигенетические регуляторы (Wojtuszkiewicz et al., 2016), а также молекулами микроРНК, которые подавляют индукцию программы апоптоза в клетках, подвергающихся воздействию цитостатиков (Bouvy et al., 2017).

Другой аспект влияния внеклеточных везикул на эффективность лекарственной терапии связан с опосредованной ими коммуникацией между лейкозными бластами и клетками микроокружения (Caivano et al., 2017).

В исследовании (Wang et al., 2019) было показано, что производимые клетками ОМЛ экзосомы воздействовали на клетки эндотелия, делая их невосприимчивыми к лекарствам, нацеленным на подавление ангиогенеза благодаря переносу цитокина VEGF, стимуляции гликолиза и устойчивости к апоптозу.

Исходя из этого, предлагаются подходы для подавления системы генерирования внеклеточных везикул с целью повышения эффективности лекарственной терапии (Wu et al., 2017; Milman et al., 2019). С другой стороны, экзосомы рассматриваются и как потенциальные эффективные векторы для доставки лекарств в злокачественные клетки (Wu et al., 2017).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в возникновении лекарственной устойчивости у клеток ОМЛ играют роль различные процессы, приводящие к приобретению ими способности переносить более высокие дозы цитостатиков и цитотоксических препаратов. Еще раз подчеркнем, что механизмы, представленные в данном обзоре, взаимосвязаны между собой, причем иногда эти связи противоречивы. Например, гиперэкспрессия *miR-181a* в ОМЛ может, как было сказано ранее, подавлять экспрессию ATM и способствовать пролиферации, хотя ATM — ключевой сенсор повреждений ДНК. В данной статье описаны далеко не все механизмы устойчивости и связанные с ними противоречия. Тем не менее, становится понятно, что каждый механизм нельзя рассматривать отдельно от других. Множественная лекарственная устойчи-

вость — комплексное явление, которое подлежит еще большему вниманию со стороны ученых и терапевтов в связи с тем, что для многих белков доказана взаимосвязь между их экспрессией и выживаемостью клеток, но совершенно не известны их непосредственные мишени.

Исследования механизмов лекарственной устойчивости, таким образом, важны для разработки грамотной сопроводительной терапии, совершенствования режимов индукционной терапии и, следовательно, улучшения прогноза для больных ОМЛ. Устойчивость лейкозных клеток к тем или иным препаратам можно преодолеть с помощью различных ингибиторов, либо непосредственно перед основным курсом терапии, либо совместно с действующими агентами. Важно отметить, что такие ингибиторы сами по себе могут быть эффективными химиотерапевтическими средствами. Однако не стоит забывать о том, что многие соединения, хорошо зарекомендовавшие себя *in vitro*, могут оказаться малоэффективными *in vivo*, а из множества активных *in vivo* веществ далеко не все смогут пройти клинические испытания вследствие высокой общей токсичности для здоровых тканей. Все эти обстоятельства являются стимулом к поиску новых природных или синтетических химиотерапевтических препаратов для комбинированной терапии.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Блохин Д.Ю. Причины ограниченной эффективности противоопухолевой терапии с позиций клеточной биологии // Рос. биотерап. журн. 2005. Т. 4. № 3. С. 18–23.
- Гольдберг В.Е., Матяш М.Г. Современные достижения лекарственной терапии злокачественных новообразований // Сиб. науч. мед. журн. 2004. № 2. С. 36–40.
- Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста: сходства и различия солидных опухолей и лейкозов // Клин. онкогематол. Фундам. исслед. клин. практика. 2012. Т. 5. № 3. С. 165–185.
- Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейко-

- зов взрослых // Гематол. и трансфузиол. 2014. Т. 59. № S2. 29 с.
- Allan J.M., Smith A.G., Wheatley K. et al. Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy // *Blood*. 2004. V. 104. № 13. P. 3872–3877.
- Auberger P., Puissant A. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia // *Blood*. 2017. V. 129. № 5. P. 547–552.
- Bertuccio S.N., Serravalle S., Astolfi A. et al. Identification of a cytogenetic and molecular subgroup of acute myeloid leukemias showing sensitivity to L-asparaginase // *Onco-target*. 2017. V. 8. № 66. P. 109915–109923.
- Bosman M.C.J., Schuringa J.J., Vellenga E. Constitutive NF- $\kappa$ B activation in AML: causes and treatment strategies // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016. V. 98. P. 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.001>
- Bouvy C., Wannez A., Laloy J. et al. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo // *Leuk. Res.* 2017. V. 62. P. 70–76.
- Caivano A., La Rocca F., Laurenzana I. et al. Extracellular vesicles in hematological malignancies: from biology to therapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 6. <https://doi.org/10.3390/ijms18061183>
- Callaghan R., Luk F., Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? // *Drug Metab. Dispos.* 2014. V. 42. № 4. P. 623–631.
- Chen X., Clark J., Wunderlich M. et al. Autophagy is dispensable for Kmt2a/Mll-Mllt3/Af9 AML maintenance and anti-leukemic effect of chloroquine // *Autophagy*. 2017. V. 13. № 5. P. 955–966.
- Chen Y., Jacamo R., Konopleva M. et al. CXCR4 downregulation of *let-7a* drives chemoresistance in acute myeloid leukemia // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 6. P. 2395–2407.
- Constance J.E., Lim C.S. Targeting malignant mitochondria with therapeutic peptides // *Ther. Deliv.* 2012. V. 3. № 8. P. 961–979.
- Corces M.R., Chang H.Y., Majeti R. Preleukemic hematopoietic stem cells in human acute myeloid leukemia // *Front. Oncol.* 2017. V. 7. P. 263.
- Cruz-Miranda G.M., Hidalgo-Miranda A., Bárcenas-López D.A. et al. Long non-coding RNA and acute leukemia // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 3. <https://doi.org/10.3390/ijms20030735>
- Daver N., Schlenk R.F., Russell N.H., Levis M.J. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence // *Leukemia*. 2019. V. 33. № 2. P. 299–312.
- De Kouchkovsky I., Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update // *Blood Cancer J.* 2016. V. 6. № 7. P. e441.
- De Necochea-Campion R., Shouse G. P., Zhou Q. et al. Aberrant splicing and drug resistance in AML // *J. Hematol. Oncol.* 2016. V. 9. № 1. P. 85.
- Di Tullio A., Rouault-Pierre K., Abarrategi A. et al. The combination of CHK1 inhibitor with G-CSF overrides cytarabine resistance in human acute myeloid leukemia // *Nat. Commun.* 2017. V. 8 (1). P. 1689.
- Djavaheri-Mergny M., Giuriato S., Tschan M.P., Humbert M. Therapeutic modulation of autophagy in leukaemia and lymphoma // *Cells*. 2019. V. 8. № 2. P. 103.
- Du Y., Chen B. Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia // *Drug Des. Dev. Ther.* 2017. V. 11. P. 1255–1261.
- Esposito M.T., So C.W.E. DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance // *Chromosoma*. 2014. V. 123. № 6. P. 545–561.
- Feng D.-D., Zhang H., Zhang P. et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia // *J. Cell Mol. Med.* 2011. V. 15. № 10. P. 2164–2175.
- Gabra M.M., Salmena L. microRNAs and acute myeloid leukemia chemoresistance: a mechanistic overview // *Front Oncol.* 2017. V. 7. P. 255.
- Grandage V.L., Gale R.E., Linch D.C., Khwaja A. PI3-kinase/AKT is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF- $\kappa$ B, MAPkinase and p53 pathways // *Leukemia*. 2005. V. 19. № 4. P. 586–594.
- Grinev V., Barneh F., Ilyushonak I. et al. RUNX1/RUNX1T1 mediates alternative splicing and reorganises the transcriptional landscape in leukemia // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 520.
- Haaland I., Opsahl J.A., Berven F.S. et al. Molecular mechanisms of nutlin-3 involve acetylation of p53, histones and heat shock proteins in acute myeloid leukemia // *Mol. Cancer*. 2014. V. 13. P. 116.
- Hakem R. DNA-damage repair: the good, the bad, and the ugly // *EMBO J.* 2008. V. 27. № 4. P. 589–605.
- Hano M., Tomášová L., Šereš M. et al. Interplay between P-glycoprotein expression and resistance to endoplasmic reticulum stressors // *Molecules*. 2018. V. 23. № 2. P. 337.
- Hanekamp D.W., Johnson M.K., Portwood S. et al. Autophagy promotes the survival and therapy resistance of human acute myeloid leukemia cells under hypoxia // *Blood*. 2014. V. 124. № 21. P. 2236.
- Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines // *Cell*. 2002. V. 110. № 6. P. 673–687.
- Jiang X., Wang Z., Ding B. et al. The hypomethylating agent decitabine prior to chemotherapy improves the therapy efficacy in refractory/relapsed acute myeloid leukemia patients // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 32. P. 33612–33622.
- Kalinina E., Andreev Y., Lubova K. et al. Redox-dependent change in the expression of genes controlling cellular ROS/antioxidants balance under formation of cancer cell resistance to cisplatin // *FEBS Open Bio*. 2018. V. 8. № S1. P. 357.
- Karathedath S., Rajamani B.M., Musheer Aalam S.M. et al. Role of NF-E2 related factor 2 (Nrf2) on chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia (AML) and the effect of pharmacological inhibition of Nrf2 // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. P. e0177227.
- Kojima K., Konopleva M., Samudio I. J. et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy // *Blood*. 2005. V. 106. № 9. P. 3150–3159.

- Konopleva M., Konoplev S., Hu W *et al.* Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins // *Leukemia*. 2002. V. 16. № 9. P. 1713–1724.
- Lagunas-Rangel F.A., Chávez-Valencia V., Gómez-Guijosa M.Á., Cortes-Penagos C. Acute myeloid leukemia – genetic alterations and their clinical prognosis // *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* 2017. V. 11. № 4. P. 328–339.
- Lainey E., Sébert M., Thépot S., Scoazec M. *et al.* Erlotinib antagonizes ABC transporters in acute myeloid leukemia // *Cell Cycle*. 2012. V. 11. № 21. P. 4079–4092.
- Liao Q., Wang B., Li X., Jiang G. miRNAs in acute myeloid leukemia // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 2. P. 3666–3682.
- Liu X., Liao W., Peng H. *et al.* miR-181a promotes G1/S transition and cell proliferation in pediatric acute myeloid leukemia by targeting ATM // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2016a. V. 142. № 1. P. 77–87.
- Liu Y., Cheng Z., Pang Y. *et al.* Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia // *J. Hematol. Oncol.* 2019. V. 12 (1). P. 51.
- Liu Y., Li Q., Zhou L. *et al.* Cancer drug resistance: redox resetting renders a way // *Oncotarget*. 2016b. V. 7. № 27. P. 42740–42761.
- Long X., Gerbing R., Alonzo T.A., Redell M.S. Distinct signaling events promote resistance to mitoxantrone and etoposide in pediatric AML: a Children's Oncology Group report // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 52. P. 90037–90049.
- Ma P., Dong X., Swadley C.L., Gupte A. *et al.* Development of idarubicin and doxorubicin solid lipid nanoparticles to overcome Pgp-mediated multiple drug resistance in leukemia // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2009. V. 5. № 2. P. 151–161.
- Maacha S., Bhat A.A., Jimenez L. *et al.* Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance // *Mol. Cancer*. 2019. V. 18. № 55. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0965-7>
- Macanas-Pirard P., Broekhuizen R., Gonzáles A. *et al.* Resistance of leukemia cells to cytarabine chemotherapy is mediated by bone marrow stroma, involves cell-surface equilibrative nucleoside transporter-1 removal and correlates with patient outcome // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 14. P. 23073–23086.
- Makishima H., Visconte V., Sakaguchi H. *et al.* Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis // *Blood*. 2012. V. 119. № 14. P. 3203–3210.
- Marquez R.T., Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch // *Am. J. Cancer Res.* 2012. V. 2. № 2. P. 214–221.
- Martelli A.M., Tazzari P.L., Evangelisti C. *et al.* Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside // *Curr. Med. Chem.* 2007. V. 14. № 19. P. 2009–2023.
- McCormack E., Haaland I., Venås G. *et al.* Synergistic induction of p53 mediated apoptosis by valproic acid and nutlin-3 in acute myeloid leukemia // *Leukemia*. 2012. V. 26. № 5. P. 910–917.
- McLornan D., Hay J., McLaughlin K. *et al.* Prognostic and therapeutic relevance of c-FLIP in acute myeloid leukemia // *Br. J. Haematol.* 2012. V. 160. № 2. P. 188–198.
- Milman N., Ginini L., Gil Z. Exosomes and their role in tumorigenesis and anticancer drug resistance // *Drug Resist. Updat.* 2019. V. 45. P. 1–12.
- Nawrocki S.T., Han Y., Visconte V. *et al.* Development of ROC-325: a novel small molecule inhibitor of autophagy with promising anti-leukemic activity // *Blood*. 2016. V. 128. № 22. P. 525.
- Pavlov V.N., Rakhmatullina I.R., Farkhutdinov R.R. *et al.* Free radical oxidation and carcinogenesis: debatable issues // *Creat. Surg. Oncol.* 2017. V. 7. № 22. P. 54–61.
- Piya S., Kornblau S.M., Ruvolo V.R. *et al.* Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia // *Blood*. 2016. V. 128. № 9. P. 1260–1269.
- Prokocimer M., Peller S. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 in a patient with therapy-related resistant AML: first report // *Med. Oncol.* 2012. V. 29. № 2. P. 1148–1150.
- Rotin L.E., MacLean N., Aman A. *et al.* Erlotinib synergizes with the poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor ethacridine in acute myeloid leukemia cells // *Haematologica*. 2016. V. 101. № 11. P. e449–e453.
- Qiu L., Zhou G., Cao S. Targeted inhibition of ULK1 enhances daunorubicin sensitivity in acute myeloid leukemia // *Life Sci.* 2020. V. 243. P. 117234.
- Salunkhe S., Mishra S.V., Nair J. *et al.* Inhibition of novel GCN5-ATM axis restricts the onset of acquired drug resistance in leukemia // *Int. J. Cancer*. 2018. V. 142. № 10. P. 2175–2185.
- Schwind S., Maharry K., Radmacher M.D. *et al.* Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. № 36. P. 5257–5264.
- Tabé Y., Konopleva M. Advances in understanding the leukemia microenvironment // *Br. J. Haematol.* 2014. V. 164. № 6. P. 767–778.
- Tan B.X., Khoo K.H., Lim T.M., Lane D.P. High Mdm4 levels suppress p53 activity and enhance its half-life in acute myeloid leukaemia // *Oncotarget*. 2014. V. 5. № 4. P. 933–943.
- Tang R., Cohen S., Perrot J.-Y. *et al.* P-gp activity is a critical resistance factor against AVE9633 and DM4 cytotoxicity in leukaemia cell lines, but not a major mechanism of chemoresistance in cells from acute myeloid leukaemia patients // *BMC Cancer*. 2009. V. 9. P. 199.
- Valdez B.C., Murray D., Nieto Y. *et al.* Synergistic cytotoxicity of the DNA alkylating agent busulfan, nucleoside analogs and suberoylanilide hydroxamic acid in lymphoma cell lines // *Leuk. Lymph.* 2012. V. 53. № 5. P. 973–981.
- Visconti R., Grieco D. Fighting tubulin-targeting anticancer drug toxicity and resistance // *Endocr. Relat. Cancer*. 2017. V. 24. № 9. P. T107–T117.
- Wang B., Wang X., Hou D. *et al.* Exosomes derived from acute myeloid leukemia cells promote chemoresistance by enhancing glycolysis-mediated vascular remodeling // *J. Cell Physiol.* 2019. V. 234. № 7. P. 10602–10614.

- Wang P., Ma D., Wang J. *et al.* INPP4B-mediated DNA repair pathway confers resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia // *Tumor Biol.* 2016. V. 37. № 9. P. 12513–12523.
- Watson A.S., Riffelmacher T., Stranks A. *et al.* Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia // *Cell Death Discov.* 2015. V. 1. P. 15008.
- Wojtuszkiewicz A., Schuurhuis G.J., Kessler F.L. *et al.* Exosomes secreted by apoptosis-resistant acute myeloid leukemia (AML) blasts harbor regulatory network proteins potentially involved in antagonism of apoptosis // *Mol. Cell Proteom.* 2016. V. 15. № 4. P. 1281–1298.
- Wong N.K., Huang C.-L., Islam R., Yip S.P. Long non-coding RNAs in hematological malignancies: translating basic techniques into diagnostic and therapeutic strategies // *J. Hematol. Oncol.* 2018. V. 11 (1). P. 131.
- Wu K., Xing F., Wu S.-Y., Watabe K. Extracellular vesicles as emerging targets in cancer: recent development from bench to bedside // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1868. № 2. P. 538–563.
- Yi H., Zeng D., Shen Z. *et al.* Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 enhances  $\beta$ -catenin signaling in acute myeloid leukemia harboring Fms-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplication mutations: implications for microenvironment influence on sorafenib sensitivity // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 26. P. 40387–40397.
- Yonekawa T., Thorburn A. Autophagy and cell death // *Essays Biochem.* 2013. V. 55. P. 105–117.
- Zachari M., Ganley I.G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation // *Essays Biochem.* 2017. V. 61. № 6. P. 585–596.
- Zheng H.-C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers // *Oncotarget.* 2017. V. 8. №. 35. P. 59950–59964.

## Mechanisms of Drug Resistance in Acute Myeloid Leukemia Cells

N. M. Bobrova<sup>a</sup> and T. V. Romanovskaya<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Alexandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology, Minsk, Belarus

<sup>b</sup>Belarusian State University, Minsk, Belarus

\*e-mail: ramanouskaya\_tv@bsu.by

Acute myeloid leukemia (AML) is a set of hematological diseases characterized by clonal expansion of immature myeloid precursors. Chemotherapy is one of the main methods of AML treatment. However, the occurrence of drug resistance in leukemic cells, being a serious obstacle to therapy of the disease, worsens the clinical outcome. It is necessary to understand the mechanisms of AML resistance to certain cytostatic and cytotoxic drugs for development of optimal treatment strategies. This review is focused on diversity of currently known mechanisms underlying drug resistance in AML on the level of intracellular molecular paths as well as on the level of intercellular communication.

**Keywords:** acute myeloid leukemia, chemotherapy, drug resistance



УДК 616-092.9

## К ПРОБЛЕМЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ СЕПСИСА

© 2021 г. М. Н. Черкасова\*

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи,  
Москва, Россия

\*e-mail: mari.cherkasova.1991@bk.ru

Поступила в редакцию 12.10.2020 г.

После доработки 13.10.2020 г.

Принята к публикации 13.10.2020 г.

Обсуждаются четыре варианта экспериментальных моделей сепсиса: инъекционных, хирургических, ожоговых, моделей пневмонии с переходом в сепсис. Проанализированы положительные и отрицательные стороны каждой из них. Отмечено, что оптимальный выбор животных является важнейшим условием для успешного моделирования сепсиса. Рассмотрены некоторые аспекты анатомии, физиологии и иммунологии, свойственные определенному виду млекопитающих. Принимая во внимание существующие различия реакций, можно отметить комплексы признаков, которые при сепсисе близки или идентичны у разных представителей животных. Однако, несмотря на ограничения, которые касаются каждой модели сепсиса, целесообразно использовать разные модели на разных видах животных. Сопоставление и сравнение полученных в процессе экспериментов результатов крайне важно для выяснения патогенетических критериев сепсиса.

**Ключевые слова:** модель, сепсис, эндотоксин, штамм, патогенез

**DOI:** 10.31857/S0042132421030054

### ВВЕДЕНИЕ

На протяжении всей истории человечества тяжелые эпидемии и пандемии поражали целые народы и уносили колоссальные количества жизней. Сегодня, когда такие особо опасные инфекции как чума и натуральная оспа остались в прошлом, на первый план вышли другие не менее тревожные проблемы, одна из которых – сепсис. Термин “сепсис” достаточно древний, происходит от греческого слова “разложение, гниение” и встречается в поэмах Гомера, трудах Гиппократ и Галена более 2.5 тыс. лет назад.

В 1914 г. немецкий врач Х. Шоттмюллер впервые сформулировал микробиологическую концепцию сепсиса. Согласно данной концепции, ведущую роль в патогенезе сепсиса играют бактерии, которые попадают в кровоток из инфекционного очага (Хаертынов и др., 2014). Длительный период изучения сепсиса, к сожалению, не привел к полному пониманию закономерностей развития этого опасного для жизни состояния. В современном представлении сепсис – это нерегулируемая системная воспалительная реакция организма на инфекционный агент, приводящая к тяжелой дисфункции жизненно важных органов, с высоким риском летального исхода. Как известно, воспалительный ответ организма подразделяется на две последовательные составляющие: провоспалительный ответ и компенсаторный противо-

воспалительный ответ. Первая составляющая (или стадия), как полагают, – результат активации механизмов врожденного иммунитета, сопровождающийся увеличением циркулирующих провоспалительных цито- и хемокинов. Развитие сепсиса происходит в том случае, когда иммунный ответ организма не может “правильно перейти” из стадии системного провоспалительного ответа в стадию компенсаторного противовоспалительного ответа и таким образом справиться с инфекцией. В этих случаях течение воспаления становится неуправляемым и завершается полиорганной недостаточностью с исходом в септический шок (Черных и др., 2001; Belikoff, Buras, 2008). Многофакторность развития сепсиса – главная причина невозможности точного воспроизведения этой патологии в экспериментальных моделях, которое позволило бы провести тщательное исследование закономерностей этого состояния. В то же время модель сепсиса, как и экспериментальная модель любого другого заболевания, должна представлять собой тестовую систему с возможностью неоднократного воспроизведения и подтверждения на патоморфологическом, патофизиологическом и биохимическом уровнях. На IX международной конференции Вигерс–Бернард (9th Wiggers–Bernard Conference), состоявшейся 3–5 мая 2017 г. в Вене, Австрия, для повышения качества и эффективности исследова-

ний были предложены руководящие принципы, рекомендации и ограничения, применимые для доклинических моделей сепсиса “Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies”, MQTiPSS. Предполагается, что эти рекомендации должны служить вспомогательной платформой при анализе полученных экспериментальных данных и способствовать повышению уровня надежности их экстраполяции на развитие сепсиса у человека (Osuchowski et al., 2018; Hellman et al., 2019; Libert et al., 2019; Zingarelli et al., 2019)

### ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ В ВЫБОРЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Важным условием успеха экспериментального моделирования сепсиса является оптимальный выбор животных. Чаще всего в лабораторных условиях используют грызунов — мышей и крыс, что в основном связано с их относительно низкой стоимостью, возможностью получения генетически выведенных особей с определенными признаками и обусловлено высокой плодовитостью и коротким жизненным циклом. Средняя продолжительность жизни лабораторной мыши (Zingarelli et al., 2019), предположительно, составляет 24 мес. (то есть 9 дней жизни мыши примерно эквивалентны 1 году жизни человека, или 1 ч ее жизни сопоставим с 40 часами жизни человека). Хотя приведенное сопоставление не в пользу мыши в качестве объекта для моделирования, даже столь краткие сроки жизни этих животных позволяют проводить повторные тестирования моделей и наблюдать повторные циклы развития сепсиса в достаточно сжатые промежутки времени. Объективным преимуществом использования в опытах мышей является и то, что их геном хорошо охарактеризован (полная геномная последовательность линии C57Bl/6 *Mus musculus* была секвенирована в 1990-х гг. Консорциумом по секвенированию генома мыши). При этом выявлено, что около 80% генов мышей имеют один идентифицируемый ортолог в геноме человека. Генетически модифицированные животные оказались очень полезными для изучения клеточных и молекулярных механизмов патологических процессов и метаболических изменений при заболеваниях человека (Stortz et al., 2017; Guillon et al., 2019). Но существующие недостатки экспериментальных моделей на грызунах, конечно, связаны с их анатомическими и физиологическими несоответствиями по отношению к организму человека и других животных (Guillon et al., 2019). В модели полимикробного сепсиса, инициированного внутрибрюшинным введением фекальной суспензии крысам линии Wistar и мышам линии C57Bl/6, проводили анализ скорости метаболизма (потребления кислорода и выделения углекислого газа), величины сердечного выброса (методом

эхокардиографии) и показателей термометрии. В организме мышей наблюдалось прогрессирующее снижение поступления кислорода с одновременным падением температуры тела, а данные метаболических изменений совпадали с выраженным нарушением систолической активности левых отделов сердца. В отличие от мышей, сниженный сердечный выброс, соответствующий изменению этого показателя у больного сепсисом человека, присутствовал только у тяжело больных крыс. К терминальной стадии (во время геморрагического шока или тяжелой гипоксии) у крыс регистрировалось снижение потребления кислорода, что, однако, не столь выражено у пациентов с сепсисом (Naouzi, van de Louw, 2013). Важной особенностью мышей, по сравнению с человеком, объясняющей их защитные механизмы в ответ на гипоксические повреждения, является высокая скорость метаболизма: у животных она выше в 15–20 раз. Это отличие можно связывать с большим количеством тепла, выделяемого через поверхность тела мыши в результате недрожжательного термогенеза, обусловленного особенностями активности разобщающих белков митохондрий. Возникающие при этом потребности кардиореспираторной системы в оксигенации сильно отличаются от потребностей этой системы у человека: например, частота сердечных сокращений у мыши очень высокая, составляет 500 ударов в минуту, в то время как частота дыхания составляет от 2 до 6 Гц (Naouzi, 2011). Из-за высокой активности антиоксидантных ферментов ткани крысы очень устойчивы к окислительному стрессу и ишемическим повреждениям — тем патогенетическим составляющим, которые во время сепсиса у человека ярко проявляются и имеют существенное значение для течения и исхода сепсиса. Дело в том, что при септическом шоке конечным медиатором вазодилатации и нарушения вазоконстрикторного ответа является оксид азота NO, а активность индуцибельной изоформы NO-синтазы (iNOS) у крыс хорошо выражена. Эта особенность объясняет повышение уровня нитритов и/или нитратов в крови септических крыс в 5–10 раз по сравнению с человеком и другими животными (свиньи, овцы и пр.) (Radermacher, Naouzi, 2013; Guillon et al., 2019). Существуют также литературные данные об успешном действии антиоксидантов или ингибиторов NO на крыс, однако аналогичных клинических данных не получено (Radermacher, Naouzi, 2013). Что касается использования для моделирования сепсиса более крупных животных с учетом большего сходства их некоторых функциональных параметров с человеком, следует отметить, что таких животных, которые бы максимально отвечали требованиям моделирования, нет. Не говоря уже о финансовых и этических аспектах, связанных с их использованием в опытах (Guillon et al., 2019).

Кроме того, у каждого из представителей крупных млекопитающих есть конкретные отличия от организма человека, которые могут быть весьма значимы для последующей экстраполяции результатов опыта на человека. Так, особенности анатомии и физиологии желудочно-кишечного тракта ограничивают использование жвачных животных (овец). При этом у овец, как и у людей, измерение уровня клиренса креатинина является маркером скорости клубочковой фильтрации, а у свиней данный показатель высок и не сопоставим с аналогичным у человека (Guillon et al., 2019). Свиньи, имеющие, как полагают, множество схожих с человеком структурно-функциональных свойств органов, отличаются повышенной склонностью к нарушениям легочных механизмов газообмена, что обусловлено недостатком коллатеральной альвеолярной вентиляции и более глубоко выраженной легочной гипертензией при патологии (Radermacher, Naouzi, 2013).

При сравнении концентрации циркулирующих цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 и IL-1RA) у человека (добровольцы), крыс и свиней после введения липополисахарида (ЛПС) (Remick et al., 2000; Nielsen et al., 2007; Ramakers et al., 2011) отмечено увеличение уровней этих факторов в плазме и перитонеальной жидкости практически в одинаковых временных точках. Таким образом, несмотря на существующие различия реакции, отмечены признаки (и даже комплексы признаков), которые при сепсисе близки или идентичны у разных представителей млекопитающих (Zingarelli et al., 2019). В то же время следует учитывать существующую разницу в чувствительности каждого вида животного к ЛПС, которая, в первую очередь, зависит от активности Toll-подобных рецепторов TLR4 (toll-like receptor 4), распознающих бактериальный ЛПС. В этом отношении человек очень чувствителен к ЛПС, и характерную клиническую картину сепсиса у человека можно вызвать введением 1 нг ЛПС на 1 кг веса. Свиньи к действию ЛПС умеренно чувствительны, и диапазон эффективных доз ЛПС измеряется мкг/кг веса; мыши еще более устойчивы — диапазон доз рассчитывается в мг/кг веса (Vaure, Liu, 2014).

### МОДЕЛИ СЕПСИСА

Существуют несколько категорий моделей, используемых в экспериментах: инъекционные, хирургические, ожоговые, модель пневмонии с последующим переходом в сепсис (Корнеев, 2019; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Chen et al., 2014).

По характеру фактора, инициирующего развитие сепсиса, выделяют следующие инъекционные модели: 1) введение животным токсинов: внутривенно или внутривенно вводится ЛПС — эндотоксин грамотрицательных бактерий, липотейхоевая кислота (ЛТК) — эндотоксин грамполо-

жительных бактерий, зимозан — полисахарид, содержащийся в клеточной стенке некоторых видов дрожжей (Volman et al., 2005; Stortz et al., 2017); чаще всего при моделировании сочетают введение ЛПС с зимозаном; 2) введение живой культуры патогена (в частности *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и т.д.).

Вариантами хирургической модели являются: имплантация зараженного материала в брюшную полость (очаг инфекции создается введением в брюшную полость желатиновых капсул со смешанным бактериальным содержимым либо с одним из штаммов возбудителя), перевязка слепой кишки с микроперфорированием ее стенки CLP (cecum ligation and puncture), стентирование брыжейки восходящей ободочной кишки CASP (colon ascendens stent peritonitis).

Суть ожоговой модели заключается в подкожном введении инфицирующего агента (*P. aeruginosa*, *S. aureus*) в участке искусственно произведенного термического ожога (Stortz et al., 2017).

Модель пневмонии с последующим развитием сепсиса предполагает первоначальное моделирование бактериального воспалительного поражения легких (Müller-Redetzky et al., 2012; Lewis et al., 2016).

### Инъекционные модели сепсиса

#### Модель эндотоксинемии — введение липополисахарида

Широкое использование моделей с введением ЛПС обусловлено достаточно простыми манипуляциями и воспроизводимостью эксперимента. ЛПС — довольно стабильное и относительно чистое органическое соединение, которое может храниться в лиофилизированной форме (Корнеев, 2019; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Murando et al., 2019). Создание этой модели основывалось на концепции, согласно которой сепсис может быть вызван не только введением патогенных микроорганизмов, но и компонентов их стенки (для грамотрицательных бактерий это эндотоксин ЛПС, для грамположительных — ЛТК). Основным доводом правомерности указанной концепции явилось то, что в кровоток пациентов реанимационных отделений, получающих высокие дозы антибактериальных препаратов, высвобождается большое количество эндотоксина из погибающих бактерий, что приводит к острому ухудшению гемодинамики и общего состояния пациентов (Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Minasyan, 2019; Sondhi et al., 2019). ЛПС может быть введен подкожно животному внутривенно либо внутривенно в зависимости от дизайна исследования (Корнеев, 2019; Murando et al., 2019). Как компонент наружной части клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий ЛПС состоит из трех доме-

нов: липида А, прикрепленного к бактериальной мембране, который заякоривает ЛПС и отвечает за его токсический эффект; основного (центрального) олигосахарида, служащего своеобразным молекулярным мостиком, связывающим липид А с О-антигеном; О-антигена, представляющего наиболее иммуногенную часть молекулы ЛПС, которая имеет уникальный состав в зависимости от штамма микроорганизма и легко распознается иммунной системой макроорганизма. По этой причине О-антиген является основой для серологической классификации грамотрицательных бактерий (Reyes et al., 2012; Park, Lee, 2013; Kingsley, Bhat, 2016; Minasyan, 2019). Известно, что система врожденного иммунитета обладает высоким потенциалом для распознавания множества микроорганизмов, а также структур их стенки, включая сахара, липиды и белки. Семейство Toll-подобных рецепторов играет важнейшую роль в обнаружении патогенов и их факторов вирулентности, в возникновении воспалительных реакций. В зависимости от типа патогенов существуют разные варианты TLRs. Например, ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий является лигандом для TLR4, а TLR2 избирательны по отношению к ЛТК, TLR9 тропны к бактериальной ДНК и ДНК герпесвирусов (Сепсис..., 2017; Park, Lee, 2013; Sondhi et al., 2019). При попадании в макроорганизм ЛПС распознается в сыворотке крови ЛПС-связывающим белком, который переносит его на мембранный корецептор CD14, экспрессирующийся на поверхности миеломоноцитарных клеток (моноцитов и макрофагов). Далее макрофаги расщепляют ЛПС на мономеры и представляют эти молекулы комплексу TLR4/MD2. Таким образом, ЛПС распознается благодаря рецепторному комплексу CD14/TLR4/MD2, который является мощным стимулятором клеток иммунной системы. В последующем инициируется сложный каскад сигналов, активирующий сигнальный путь NF- $\kappa$ B (Liang et al., 2009), приводя к высвобождению цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ), интерлейкинов IL-1, -1 $\beta$ , -6, -8, -10 и -12, интерферона гамма (IFN $\gamma$ ), хемокинов, простагландинов, а также активных форм кислорода (АФК). Эти соединения как провоспалительные медиаторы рекрутируют и активируют дополнительные иммунные клетки для активации воспаления (Сепсис..., 2017; Liang et al., 2009; Reyes et al., 2012; Park, Lee, 2013; Kingsley, Bhat, 2016; Minasyan, 2019; Sondhi et al., 2019). Показано, что ЛПС, поглощенный клетками Купфера, высвобождается в паренхиматозные клетки печени, где происходит ферментативная нейтрализация жирных кислот и О-антигена (Sondhi et al., 2019).

Описанным выше процессам, происходящим при введении ЛПС, соответствует довольно быстрое наступление системных клинических проявлений, включающих снижение двигательной ак-

тивности, появление вялости, дрожи, пилоэрекции, нарушение функций гемостаза — активация системы комплемента и факторов свертывания крови, лактоацидоз, заканчивающийся, в основном, развитием грозных осложнений — диссеминированным внутрисосудистым свертыванием крови, нарушением сократительной способности миокарда, системной артериальной гипотензией, острой полиорганной недостаточностью, приводящим к летальному исходу за достаточно короткий период времени (Minasyan, 2019; Murando et al., 2019). Однако у мышей в условиях моделирования сепсиса с помощью ЛПС наблюдались: быстро наступающая эндотоксемия (Buras et al., 2005; Nemzek et al., 2008; Murando et al., 2019), кратковременный монофазный подъем уровня циркулирующего TNF, продолжительное повышение уровня циркулирующего IL-6 и отсутствие увеличения уровня группы белков высокой подвижности HMGB-1 (high-mobility group box 1), что свидетельствует о неполном соответствии этой модели развитию сепсиса у человека (Liang et al., 2009). В целом цитокиновые профили у септических мышей оказались на несколько порядков выше, чем у людей. Показано, что в сыворотке мышей присутствуют некоторые факторы, нейтрализующие выработку цитокинов, но их природа на данный момент мало изучена. Группой ученых (Liang et al., 2009) с помощью метода хроматографии был идентифицирован гем-связывающий белок — гемопексин. Получены данные, что в сыворотке мыши при сепсисе повышается уровень гемопексина, который, взаимодействуя с макрофагами, подавляет продукцию последними TNF и IL-6, тормозя развитие системного воспалительного процесса, инициированного ЛПС (Liang et al., 2009). Существенным замечанием следует считать то, что концентрации ЛПС, способные вызвать сепсис у лабораторных мышей, широко варьируют в зависимости от происхождения эндотоксина и линии мышей (Stortz et al., 2017). Например, линии мышей C57Bl/6J, DBA2, BALB/c, C3H/ARC отличаются от линии C3H/HeJ, по меньшей мере, двумя генетическими локусами, имеющими существенное значение в реализации врожденного иммунного ответа. И, вероятно, в этой связи штамм C3H/HeJ низкочувствителен к ЛПС, тогда как четыре других обозначенных выше линии мышей к этому агенту достаточно восприимчивы (Vaure, Liu, 2014). Не соответствие в степени чувствительности к ЛПС организма человека и мыши отмечено в ряде исследований, что ставит под сомнение целесообразность использования данного метода моделирования сепсиса (Copeland et al., 2005; Nemzek et al., 2008; Murando et al., 2019). Для увеличения чувствительности мышей к эндотоксину предпринимались попытки параллельно введению ЛПС вводить животным D-галактозамин. Одна-

ко гепатотоксичность D-галактозамина в значительной степени искажала развитие клинической картины сепсиса и создавала еще больше препятствий для сопоставления результатов модели с развитием сепсиса у человека (Buras et al., 2005; Nemzek et al., 2008; Kingsley, Bhat, 2016).

В заключение хотелось бы отметить, что ЛПС — только один из факторов вирулентности грамотрицательных бактерий, и сам по себе он не вызывает сепсис у человека. Кроме ЛПС, в арсенале грамотрицательных бактерий существует множество ферментов, экзотоксинов и пигментов, которые также оказывают негативное влияние на макроорганизм (Minasyan, 2019).

### Введение зимозана

Еще одной из предложенных инъекционных моделей сепсиса является внутрибрюшинная инъекция мышам частиц зимозана (Volman et al., 2005; Stortz et al., 2017). Данное вещество представляет собой компонент клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которое получают путем кипячения и расщепления трипсином. В своем составе зимозан содержит несколько полисахаридов: бета-глюкан, маннан и хитин. Поскольку зимозан может фагоцитироваться макрофагами и стимулировать воспалительные реакции, его используют в изучении механизмов врожденного иммунного ответа, фагоцитоза и регуляции продукции цитокинов. Фагоцитоз частиц зимозана происходит при участии рецепторов: Dectin-1, TLR2, TLR6 и интегрин Mac-1 (Любимов и др., 2016; Volman et al., 2005; Municio et al., 2013; Jiang et al., 2013). Известно, что зимозан участвует в секреции АФК, TNF- $\alpha$ , а также IL-1 $\beta$ , -6, -8. Существуют три пути, с помощью которых зимозан активирует секрецию цитокинов. Во-первых, в сыворотке крови содержится иммуноглобулин IgG, который, связываясь с зимозаном, образует комплексы с последующей активацией классического пути системы комплемента; далее происходит высвобождение TNF- $\alpha$  путем перекрестного связывания с Fc-рецептором макрофагов. Во-вторых, зимозан активирует комплемент через альтернативный путь: связывание C3b/iC3b с зимозаном позволяет поглощать частички через рецепторы комплемента на макрофагах и гранулоцитах. В-третьих, связывание C3b с поверхностью зимозана приводит к увеличению конверсии C5 в C5a, вызывая высвобождение TNF- $\alpha$ . Все эти пути действуют синергически, вызывая высвобождение TNF- $\alpha$ , однако механизмы, с помощью которых другие цитокины индуцируются зимозаном, менее известны. Высвобождение IL-1 $\beta$  и IL-6 макрофагами частично зависит от воздействия TNF- $\alpha$ , а повышение секреции IL-8 активируется при фагоцитозе зимозана моноцитарными клетками (Любимов и др.,

2016; Volman et al., 2005). Было показано, что при введении зимозана грызунам в дозировке 0.8–1.0 мг/г наблюдается сильный воспалительный ответ с высвобождением широкого спектра медиаторов воспаления, который, главным образом, зависит от TLR2 и TLR6 (Jiang et al., 2013). Поскольку зимозан не подвергается разрушению, процесс его фагоцитоза макрофагами приводит к длительному воспалительному ответу (Volman et al., 2005). После фагоцитоза зимозана макрофаги высвобождают лизосомальные ферменты, АФК, простагландины и лейкотриены, арахидоновую кислоту и TNF- $\alpha$  (Volman et al., 2005). В то же время замечено, что способность зимозана стимулировать воспалительные реакции цитокинов слабее, чем у других растворимых стимуляторов TLR2. Одной из причин, по-видимому, является то, что зимозану необходим прямой контакт с клетками врожденного иммунитета для активации пути TLR2 (Jiang et al., 2013). Следует отметить, что, в отличие от ЛПС, реакция макроорганизма на зимозан является трехступенчатой. Ранний провоспалительный ответ, при котором у животных развивается острая картина перитонита (с характерной клинической картиной — диарея, вялое поведение и снижение массы тела), продолжается около 1–2 дней. В анализах присутствует лейкопения, увеличивается потребление кислорода, повышаются уровни миелопероксидазы в легких, увеличивается проницаемость эндотелия. Смертность на этом этапе обычно составляет от 10 до 35%. Оказалось, что небольшие дозы ЛПС предотвращают гиперреакцию организма грызунов на зимозан. На втором этапе, который длится 3–5 дней, состояние выживших животных восстанавливается, признаки перитонита отсутствуют. Однако на 7-й день животные становятся вялыми, дыхание — затрудненным, падает температура тела. Между 7-м и 14-м днями смертность составляет от 20 до 30%. При гистологическом анализе выявлены изменения, которые указывают на генерализованный системный воспалительный процесс с обширными повреждениями и отеком органов, массивными кровоизлияниями в легких. В печени отмечается накопление макрофагов и мононуклеарных клеток, образующих гранулемоподобные структуры. В селезенке регистрируются выраженные структурные изменения в красной и белой пульпе с увеличением количества мегакариоцитов и плазматических клеток, увеличение активности матриксных металлопротеиназ — класса ферментов, катализирующих деградацию тканей. Третий этап характеризуется высокой летальностью животных из-за прогрессирования полиорганной недостаточности.

Преимуществом данной модели является достаточно продолжительный период течения сепсиса до его исхода в полиорганную недостаточность, что позволяет подробно наблюдать дина-

мику развития сепсиса. Недостатком модели является циклический вариант течения сепсиса и не всегда сопоставимые показатели экспрессии цитокинов, активации макрофагальной реакции и длительности фагоцитоза зимозана с аналогичными показателями у человека (Volman et al., 2005).

### Введение живой культуры патогена

**Введение живых бактерий.** Позднее был предложен еще один вариант моделирования сепсиса, основанный на внутрибрюшинной или внутривенной инъекции живой бактериальной культуры одного штамма (Lewis et al., 2016; Murando et al., 2019). Для моделирования применялись различные виды бактерий: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и многие другие (Lewis et al., 2016). Показано, что летальность животных в ходе эксперимента, в первую очередь, зависит от количества введенных бактерий, путей введения и сопутствующего применения антибиотиков (Lewis et al., 2016). Например, если бактерии вводили в высоких дозах, то они не колонизировались и не размножались в макроорганизме, так как практически мгновенно лизировались системой комплемента, при этом возникал не сепсис, а состояние эндотоксинемии (Murando et al., 2019), которое проявлялось характерным молниеносным течением, снижением гемодинамики, бурной экспрессией цитокинов и при отсутствии своевременной реанимации приводило к молниеносной летальности (Porov, Pavlov, 2013). При анализе инъекционных моделей с использованием живого возбудителя менее сложным и более атравматичным является внутрибрюшинный способ заражения (Lewis et al., 2016). Следует отметить важную деталь: при различных путях введения бактерий регистрируется разница в ответе цитокинов, которая характеризуется более выраженной экспрессией TNF- $\alpha$ , IL-6 и -1 при внутривенном введении, нежели при внутрибрюшинном (Chen et al., 2014). В литературе также имеют место исследования, в которых сепсис был моделирован с последующим введением антибиотиков и проведением инфузионной терапии. Это способствовало выживанию животных в течение более длительного времени, что позволяло авторам этих исследований более детально регистрировать и анализировать структурно-функциональные перестройки органов (Lewis et al., 2016). Однако антибиотикотерапия не всегда имеет положительное вспомогательное значение, и даже напротив, антибиотики, разрушая компоненты клеточной стенки бактерий и грибов, способствуют выраженному воспалительному ответу, сопровождающемуся высоким уровнем TNF- $\alpha$  и ухудшением гемодинамики с исходом в коллапс (Poli-de-Figueiredo et al., 2008). Несмотря на скепти-

цизм некоторых исследователей по отношению к данной модели, ее можно контролировать, вводя оптимальное количество бактериальной культуры. Кроме того, при инъекции одного штамма бактерий возможно изучение специфических путей метаболизма макроорганизма, на которые влияет определенный, заведомо выбранный штамм возбудителя, что невозможно осуществить, например, в модели лигирования слепой кишки (Poli-de-Figueiredo et al., 2008). Следует заметить, что существует ряд видоспецифических особенностей взаимодействия макроорганизма и бактерий. Так, например, штамм *Salmonella typhi* не вызывает генерализованную инфекцию у лабораторных мышей, но ответствен за возникновение брюшного тифа у человека. У мышей есть родственный штамм *Salmonella typhimurium*, который инициирует системную инфекцию и обычно используется в моделировании брюшного тифа, несмотря на его низкую вирулентность для человека. Таким образом, один штамм может вызывать широкий спектр клинических проявлений, в том числе в зависимости от экспрессии генов вирулентности (Poli-de-Figueiredo et al., 2008).

**Введение штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, охарактеризованных по наличию разных генов вирулентности.** В практику моделирования сепсиса входит также применение штаммов, выделенных из разных очагов инфекции у человека: ожоговых ран, крови септических больных, смывов бронхоальвеолярного лаважа и др. (Боровая и др., 2017; Черкасова и др., 2020; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Cherkasova et al., 2020). При моделировании сепсиса введением живых культур ключевое значение имеет то, какие штаммы бактерий — клинические или лабораторные — вводятся, поскольку вирулентность этих штаммов может существенно различаться. Например, липид А, входящий в состав эндотоксина ЛПС *P. aeruginosa*, отличается по структуре и активности у клинического и лабораторного штаммов (Hajjar et al., 2002). На течение сепсиса и уровень летальности при сепсисе в значительной мере влияют различия микроорганизмов по наборам генов вирулентности, по их экспрессии или репрессии у конкретного вида и штамма возбудителя (Mora-Rillo et al., 2015). Известно, что *P. aeruginosa* располагает богатым спектром факторов вирулентности, которые способствуют повреждению органов и генерализации инфекционного процесса (Лазарева и др., 2015). Введение *P. aeruginosa* в эукариотическую клетку токсинов, обусловлено системой секреции III типа (ССТТ). Считается, что при ССТТ введение белков-эффекторов U (exoU), S (exoS), T (exoT), Y (exoY) происходит при контакте с клетками макроорганизма путем формирования канала для транслокации этих бактериальных эффекторов в клетки. Данные белки-эффекторы оказывают разнообразное влияние на клетки: exoS индуци-

рует апоптоз, ингибирует миграцию клеток, разрушает плотные контакты и актиновый цитоскелет в эпителиальных (и, вероятно, в эндотелиальных) клетках; *exoT* подавляет деление и миграцию клеток, вызывая их гибель (кроме того, *exoS* и *exoT* ингибируют поглощение бактерий эпителиальными и фагоцитарными клетками, а также подавляют функции нейтрофилов и макрофагов); *exoU* обладает активностью фосфолипазы A2, приводя к быстрой смерти многие типы клеток; *exoY* представляет собой аденилатциклазу, которая способна разрушать актиновый цитоскелет. Совместное негативное влияние вышеназванных белков-эффекторов на механизмы врожденного иммунного ответа макроорганизма способствует генерализации инфекции с неблагоприятным исходом (Engel, Balachandran, 2009). Предложена модель сепсиса (Боровая и др., 2017; Черкасова и др., 2020; Cherkasova et al., 2020), основанная на внутрибрюшинном введении мышам линии C57Bl/6 суточной бульонной культуры штаммов *P. aeruginosa*. Первый штамм — *P. aeruginosa* 1840 — был выделен из раневого отделяемого ожогового больного, второй штамм — *P. aeruginosa* 1623 — из бронхиального смыва больного, находившегося на искусственной вентиляции легких. Данные штаммы были протестированы на наличие или отсутствие генов экзотоксинов ССТТ методом полимеразной цепной реакции. Было выявлено, что штамм *P. aeruginosa* 1840 содержит *exoU*, *exoT*, *exoY*, а штамм *P. aeruginosa* 1623 — *exoS*, *exoT*, *exoY*. Таким образом, эти два штамма различались по содержанию генов *exoU* и *exoS*. При анализе гистологической картины печени, почек и селезенки подопытных животных было отмечено, что штамм *P. aeruginosa* 1840, обладающий набором генов *exoU*, *exoT*, *exoY*, вызывал наиболее глубокие деструктивные изменения печени, а также гипоплазию белой пульпы селезенки; в то время как штамм *P. aeruginosa* 1623, имеющий гены *exoS*, *exoT*, *exoY*, приводил к выраженным структурным нарушениям почек и гиперплазии белой пульпы селезенки. Реактивные изменения легких в обеих группах были сходными и заключались в наличии неаэрированных участков (участков ателектазов) с признаками геморрагий, наряду с гипераэрированными участками, разрушением стенок легочных ацинусов и альвеол в участках гипераэрации, в кламатозе апикальных фрагментов эпителиоцитов мелких бронхов. В обеих опытных группах был зарегистрирован акантоз эритроцитов как признак их старения. Из полученных результатов следует, что существуют достоверные и выраженные различия морфогенетических реактивных изменений органов (печени, почек, селезенки) в моделях, инициированных введением генотипически различающихся штаммов *P. aeruginosa*.

### Хирургические модели

Первые хирургические модели сепсиса были разработаны еще в конце 1960-х—начале 1970-х гг. Бактериальная контаминация брюшной полости является наиболее частой причиной септического перитонита у людей, характеризующегося инфильтрацией брюшной полости нейтрофилами и перитонеальными макрофагами, представляющими первую линию защиты от бактерий. При отсутствии в организме функциональных механизмов, способных локализовать бактериальный очаг в перитонеальной полости (осумковать или уничтожить), инфекция попадает в кровоток и активирует системный иммунный ответ (Hotchkiss, Karl, 2003).

### Модель имплантации зараженного патогенными микроорганизмами материала в брюшную полость

В середине прошлого столетия были предложены модели сепсиса, использующие внутрибрюшинное введение желатиновых гранул или фибриновых сгустков, содержащих в своем составе один штамм возбудителя или фекальный материал. Для предотвращения быстрого разрушения содержимого капсул, увеличения выживаемости и длительности развития реакции подопытных животных им вводился вспомогательный компонент — сульфат бария (Murando et al., 2019).

Изначально сепсис моделировали имплантацией в брюшную полость животных их собственных фекалий. Результаты опытов были неудачными по причине присутствия у животных высокой степени толерантности к их собственной кишечной микрофлоре.

Для решения возникшей проблемы были предложены другие подходы, в частности, инокуляция смешанного фекального содержимого, полученного от других животных. Таким способом был смоделирован полимикробный сепсис с выраженным гипердинамическим ответом организма и высокой летальностью (Popov, Pavlov, 2013). После введения фекальных гранул первоначально развивается острый сепсис, уровень смертности от которого составляет около 40% через три дня. При посевах крови отмечается преобладание аэробных бактерий (в основном *E. coli* и *Enterococcus* sp.). У выживших мышей через 5–7 дней начинается вторая фаза заболевания, проявляющаяся в развитии внутрибрюшных абсцессов, в которых преобладают анаэробы *B. fragilis* и *F. varium* (Murando et al., 2019). Процент летальности животных в этих опытах в основном зависит от состава введенных фекалий, который напрямую связан с особенностями кормления мышей (Murando et al., 2019). Следует отметить, что моделирование введением фекальных гранул является, по сути, не моделью абдоминального сепсиса, а



моделью абдоминального абсцесса как последствия перитонита. Недостатком данной модели является невозможность точной оценки количества вводимых микроорганизмов, которое, естественно, определяет и степень тяжести, и длительность течения сепсиса. Именно этот недостаток является причиной невоспроизводимости модели. Соответственно, потребовались новые разработки моделей, которые отвечали бы, в первую очередь, условиям стандартизации (Murando et al., 2019).

Животным стали вводить внутрибрюшинно бактерии, заключенные в фибриновые сгустки. В проведенных опытах обнаружена разница в летальности крыс, которым внутрибрюшинно введена суспензия *E. coli* в физиологическом растворе, и крыс, которым имплантировали фибриновый сгусток, содержащий такое же количество бактерий *E. coli*. В первой группе летальность в течение 24 ч составляет 100%, во второй — достигает 90% только к десятому дню. Недостатком модели по имплантации фибринового сгустка является сложность хирургического вмешательства, проводимого под общим наркозом. Кроме того, фибрин препятствует высвобождению бактерий из сгустка, что впоследствии приводит к частому развитию хронического внутрибрюшинного абсцесса (Popov, Pavlov, 2013).

#### **Модель перевязки слепой кишки с нанесением микроперфораций на ее стенке — CLP-модель**

В ранних опытах на собаках и свиньях хирургические модели состояли в нарушении кровоснабжения сегмента кишечника. Техника заключалась в перевязке слепой кишки ниже илеоцекального клапана для избежания обтурации кишечника. Перевязанная слепая кишка подвергалась трансмуральному некрозу с развитием септического процесса. Такая модель плохо воспроизводилась по причине значительного варьирования численности и штаммов бактерий в кишечнике разных животных и различий в интенсивности реакции организма в разные периоды времени (Popov, Pavlov, 2013; Murando et al., 2019).

В 1979 г. группой ученых (Wichterman et al., 1980) продемонстрировано, что перевязка слепой кишки мыши приводит не к сепсису, а лишь к появлению абсцессов брюшной полости. Для улучшения модели эти авторы дополнили лигирование слепой кишки микроперфорированием ее стенки, что позволило получить постоянное бактериальное обсеменение брюшной полости. Данные эксперименты завершились развитием у животных сепсиса, в основе которого было сочетанное влияние на организм как полимикробной бактериемии, так и некротических масс ишемизированной и поврежденной стенки слепой кишки

(Murando et al., 2019). Хирургическая процедура модели заключается в следующем: слепая кишка выводится наружу через небольшой разрез стенки брюшной полости, производят ее лигирование дистальной илеоцекального клапана и прокалывают стенку. В контрольной группе слепая кишка также выводится, затем возвращается в брюшную полость без лигирования и прокола (Popov, Pavlov, 2013). В одном из исследований (Delano et al., 2007) у некоторых мышей в условиях аналогичного опыта отсутствовало развитие септического шока, а наблюдался переход от острого воспалительного ответа к хроническому воспалительному состоянию. Также была выявлена тенденция образования внутриабдоминальных абсцессов (Maier et al., 2004; Stortz et al., 2017), сопровождающихся повышением уровней провоспалительных цитокинов и изменением миелопоэза (Delano et al., 2007; Stortz et al., 2017). Преимущество использования рассматриваемого варианта модели заключается в том, что оператор может контролировать количество содержимого слепой кишки, выделившегося в брюшную полость, и величину ишемического повреждения кишки, изменяя диаметр иглы и/или длину перевязанного участка кишки. Следует заметить, что эта модель, наряду с положительными качествами, имеет также недостатки, хотя получила название “Золотой стандарт моделирования сепсиса”. В частности, результаты моделирования в значительной степени зависят от качества исполнения операции, консистенции каловых масс в просвете слепой кишки (Stortz et al., 2017; Murando et al., 2019), анатомических особенностей слепой кишки и разницы в количестве и составе микробиоты толстой кишки у разных животных. В этой связи рассматриваемую модель очень сложно стандартизировать. Кроме того, довольно частой проблемой в этой области моделирования является инициация молниеносного сепсиса либо развитие внутрибрюшинного абсцесса (Mutlak et al., 2013). Данный вариант модели невозможно воспроизвести на новорожденных мышках из-за малого размера их слепой кишки и неполного развития кишечника в целом (Wynn et al., 2007).

#### **Модель стентирования брыжейки восходящей ободочной кишки — CASP-модель**

В 1998 г. группой исследователей (Zantl et al., 1998) разработана модель хирургического сепсиса — стентирование брыжейки восходящей ободочной кишки — CASP-модель, основанная на установке стента в восходящую ободочную кишку. Идея заключалась в допущении на практике расхождения анатомоза после резекции кишки с последующим развитием перитонита и септического шока. В ходе опытов было зарегистрировано, что смертность животных от септического шока за-

висит от диаметра стента: с его увеличением смертность возрастает. Положительной чертой модели являлось то, что в ней достигаются состояние дисфункции органов (почек, легких, мозга) и активация продукции IL-1 или IFN $\gamma$ , характерных для сепсиса у человека. Модель CASP (Stortz et al., 2017), выполненная на мышах, включает имплантацию стента заданного диаметра в ободочную кишку, обеспечивающего постоянную утечку кишечного содержимого в брюшную полость с инициированием перитонита и полимикробного сепсиса. Модель стентирования характеризуется тем, что вызывает перитонит диффузного характера, в отличие от очагового перитонита при CLP-модели (Buras et al., 2005; Stortz et al., 2017). В модели стентирования регистрируется экспоненциальное увеличение количества бактерий, высеваемых из брюшной полости, тогда как в CLP-модели отмечен кратковременный и небольшой начальный пик, затем следует период снижения количества бактерий, и далее — молниеносное увеличение их числа в брюшной полости. Если в CLP-модели невозможно контролировать количество бактерий, то в модели стентирования это более реально благодаря выбору стента определенного диаметра (Zantl et al., 1998; Buras et al., 2005; Murando et al., 2019). Кроме того, в модели стентирования бактериемия зарегистрирована через 12 ч, и через 2 ч после установки стента в сыворотке крови уже отмечаются повышенные уровни циркулирующего ЛПС, цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1, -6, -10, MCP-1 и др., возрастающие пропорционально повышению КОЕ бактерий (Maier et al., 2004; Stortz et al., 2017). Подобно CLP-модели, когда летальность опытных животных напрямую зависит от размера иглы, с помощью которой производится перфорация, в модели стентирования смертность животных и тяжесть заболевания зависят от диаметра стента (Popov, Pavlov, 2013; Stortz et al., 2017). Позднее анализ результатов модели (Zantl et al., 1998) позволил дополнить этот вариант моделирования повторными хирургическими вмешательствами для удаления стента в определенное время (через три, пять и девять часов). Удаление стента через три часа привело к 100% выживаемости животных, а через девять часов — сопровождалось 100%-ной летальностью. Операция, выполненная через пять часов, характеризовалась средней численностью смертей животных (Stortz et al., 2017). С одной стороны, модель стентирования ободочной кишки воспроизводит клинические признаки острого перитонита, не нарушая васкуляризации кишечника с последующим некрозом и образованием абсцесса, как это происходит в CLP-модели. Однако, с другой стороны, она больше напоминает модель эндотоксинемии и характеризуется сложностью установки стентов. Кроме того, в просвет стента непрерывно диффузно и

неконтролируемо высвобождается большое количество бактериальной микрофлоры ободочной кишки (Popov, Pavlov, 2013; Stortz et al., 2017).

В 2013 г. предложена модель лигирования части слепой кишки с последующим отсечением сформированной культи. Культи оставлялась в брюшной полости и по мере прогрессирования некротических изменений служила источником инфицирования брюшной полости. Положительно в этой модели то, что некротическая культи кишки не инкапсулируется (Mutlak et al., 2013). Однако модель сложно стандартизировать, так как бактериальный состав содержимого кишки у разных животных варьирует не только от линии к линии, но и между животными одной линии и даже одного помета. Поэтому характер реактивных изменений, гематологических, иммунологических и биохимических показателей в разных опытах этого варианта моделирования может существенно отличаться (Popov, Pavlov, 2013; Murando et al., 2019).

Часто для улучшения выживаемости животных в моделях сепсиса (особенно в хирургических моделях) применяются антибиотики. В разных исследованиях применяют разные виды и комбинации этих препаратов, что объясняет имеющиеся разногласия в интерпретации результатов проведенных опытов и ставит дополнительные препятствия для стандартизации модели (Popov, Pavlov, 2013; Lewis et al., 2016; Kennedy et al., 2018; Murando et al., 2019).

Следует отметить, что при хирургическом моделировании сепсиса используется метод общей анестезии животных. Долгое время на выбор метода обезболивания обращали мало внимания, в то время как практически все анестетики негативно влияют на деятельность сердечно-сосудистой системы, изменяя активность перфузии органов кровью и требуя времени на восстановление организма после наркоза. Иными словами, любой анестетик оказывает дополнительное негативное влияние на организм, и с разными способами анестезии могут быть связаны противоречивые результаты исследований (Lindenblatt et al., 2005; Uhlig et al., 2015; Lewis et al., 2016).

#### Ожоговая модель

Ожоговая модель — нанесение термического ожога на участок кожи животного с последующим подкожным введением инфицирующего агента (*P. aeruginosa*, *S. aureus*). Важная особенность ожоговых ран кожи (в отсутствие своевременного и адекватного лечения) — легко возникающее инфицирование и развитие генерализованного воспалительного процесса (Dai et al., 2011; Abdullahi et al., 2014). Это их свойство использовано при создании ожоговой модели сепсиса. В ос-

новном при моделировании применяют горячую воду или нагретый металл, вызывающие прямой контактный ожог. Выбор времени контакта с водой или с металлом и температуры последних зависит от того, какую глубину ожога требуется получить (Dahiya, 2009; Qu, Nourbakhsh, 2017; Ogunniyi et al., 2018). В настоящее время предложен широкий спектр способов нанесения ожоговой травмы в опытах на грызунах и более крупных животных. Процедура нанесения термического ожога заключается в следующем: животному (например, мыши) дают общий наркоз, сбрасывают шерсть на участке кожи и затем к этому участку прикладывают разогретую металлическую пластину определенной площади на 6–45 с (время экспозиции определяется экспериментатором). Известная площадь поверхности пластины обеспечивает контроль площади повреждения тканей, а температура и экспозиция определяют глубину и степень ожога (Qu, Nourbakhsh, 2017). Возможен и другой вариант нанесения ожога: выбритый участок кожи с помощью специального устройства оставляют на теле животного открытым (при экранировании остальной части тела) и подвергают его воздействию горячей воды с температурой 90°C в течение 10 с. После нанесения ожога мышам вводят раствор Рингера для восстановления водно-электролитного баланса (Haynes et al., 2005; Hamerly et al., 2017). Дальнейший этап моделирования заключается в инфицировании животного, получившего ожог. Для этого в область ожога глубоко подкожно вводится патоген (чаще *P. aeruginosa* либо *S. aureus*) в дозе  $10^2$ – $10^3$  КОЕ/особь (Haynes et al., 2005; Hamerly et al., 2017). Показано, что *P. aeruginosa* взаимодействует с тканями на основе адгезии к анионным боковым цепям гепарансульфата. Указанные патогенные микроорганизмы — одна из основных причин осложнений у пациентов ожоговых отделений (Haynes et al., 2005). По достижении пороговой концентрации бактерий в очаге (приблизительно равной  $10^9$  КОЕ/г ткани) *P. aeruginosa* распространяется системно, вызывая сепсис с последующей полиорганной недостаточностью, и, в конечном итоге, приводит к смертельному исходу. Гибель животных в ожоговых моделях наступала примерно через 24–48 ч после нанесения ожога и заражения (Hamerly et al., 2017). Массивная инфильтрация нейтрофилами, характерная для термического повреждения, имеет отрицательный биологический эффект: активированные нейтрофилы высвобождают гидролитические ферменты, которые в сочетании с бактериальными протеолитическими ферментами усиливают протеолиз тканей, усугубляя деструктивные изменения в очаге ожога. Как известно, в балансе защитных и деструктивных механизмов воспаления важную роль играют медиаторы воспаления. Одна из важных групп медиаторов воспаления —

протеоглики группы гепарансульфатов, представляющие собой молекулы, экспрессируемые практически всеми клетками организма. В числе важнейших представителей семейства гепарансульфатов можно назвать синдеканы. Синдеканы участвуют в заживлении ран, ангиогенезе, проницаемости сосудов, модуляции активности хемокинов. При повреждении тканей активируется выделение синдекана-1 и повышение его уровня в крови. При ожоговом сепсисе LasA-протеаза, продуцируемая *P. aeruginosa*, вызывает активацию образования синдекана-1. При инфицировании участка термической травмы *P. aeruginosa* происходят колонизация ожоговой раны *P. aeruginosa* и девакуляризация области ожога, что обеспечивает идеально подходящую среду для роста *P. aeruginosa*.

В другом варианте модели ожогового сепсиса, исследователи вместо *P. aeruginosa* в ожоговую рану вводили культуру *S. aureus*. Было зарегистрировано увеличение экспрессии синдекана-1 на эндотелиальных клетках посредством действия альфа- и бета-токсинов (Park et al., 2003; Haynes et al., 2005).

У линейных мышей, у которых отсутствует ген синдекана-1, зарегистрирована сниженная экспрессия генов провоспалительных цитокинов, сниженные темпы развития сепсиса и более низкая смертность в ожоговой модели с применением *P. aeruginosa*. В литературных источниках также отмечено, что при ожоговом сепсисе, вызванном *P. aeruginosa*, в окружении кровеносных сосудов через 8 ч после инфицирования области ожога формируются биопленки этих бактерий, что может играть важную роль в генерализации инфекции (Schaber et al., 2007).

В целом, при создании ожоговых моделей сепсиса в разных исследованиях часто существенно варьируют фактор температуры, продолжительность и площадь воздействия термического раздражителя на кожу. Отмечено, что крысы могут переносить площадь ожоговой раны до 60% от их общей поверхности тела — для нанесения им глубокого ожога кожи требуется 12 с при температуре воды 70°C, а для формирования ожога более тяжелой формы необходима температура до 100°C и 8 с экспозиции. Мыши могут переносить ожоги, в том числе глубокие, до 30% от всей поверхности тела при температуре от 54° до 100°C и времени воздействия от 6 до 45 с (Pereira, Hernndon, 2005; Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). Если рассматривать ожоговые раны мыши и человека с позиций патологической анатомии, то заметна существенная разница в их строении (Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). У грызунов эпидермис и дерма более тонкие (Wong et al., 2011; Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017), волосные фолликулы у мышей и крыс богаты стволовыми клетками, с чем связана

быстрая кератинизация и заживление ран без рубцевания (Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). Травмированная кожа грызунов заживает в большей степени за счет сокращения раны, а у человека заживление происходит посредством реэпителизации и грануляции (Abdullahi et al., 2014; Qu, Nourbakhsh, 2017). Кожа мыши уникальна тем, что четко выражен панникулусный карнозус — тонкий скелетный мышечный слой (Dahiya, 2009; Wong et al., 2011; Abdullahi et al., 2014), отсутствующий у человека.

Серьезный аргумент, ограничивающий использование данной модели, — применение общей анестезии. Известно, что основные риски общего наркоза у мелких лабораторных животных — гипотензия, гипоксемия, гиповентиляция и гипотермия. Пол и возраст животного могут сильно влиять на дозировку анестетика из-за различий в уровне метаболизма и мышечной массы тела (Zambricki, Dalecy, 2004; Uhlig et al., 2015). У мышей физиологические функции, иммунный ответ и гемостаз в большой мере зависимы от температуры тела (Lindenblatt et al., 2005; Uhlig et al., 2015).

Таким образом, ожоговая модель имеет довольно много ограничений, которые ставят под сомнение использование ее в качестве основной для воспроизводства сепсиса в эксперименте.

#### *Модель пневмонии с последующим развитием сепсиса*

Одна из частых и распространенных причин развития сепсиса у человека — пневмония. По данным статистики наиболее часто встречается внебольничная пневмония. Внутрибольничная пневмония приобретается в основном в отделениях интенсивной терапии и у пациентов с тяжелым сепсисом затрагивает до 70% легких. Широкий спектр патогенов с высокой резистентностью к антибиотикам рассматривается как причина этого вида патологии. Наиболее частыми бактериальными агентами во внебольничной пневмонии являются *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и др. Основной причиной внутрибольничных пневмоний в основном признаны *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., *Serratia*, *Proteus* spp., *E. coli* или *Klebsiella* spp. и др., а также грибы *Candida* spp., *Aspergillus niger* и вирусы. При развитии пневмонии возбудители прикрепляются к эпителиальным клеткам нижних отделов дыхательных путей и транслоцируются через эпителий, приводя к бактериемии и генерализации инфекции (Müller-Redetzky et al., 2012; Lewis et al., 2016). Для правильного понимания патогенетических звеньев перехода пневмонии в сепсис были предложены модели, использующие разные пути

введения бактерий: интраназальный, интратрахеальный и аэрозольный. При интратрахеальном введении возбудителя применяется общая анестезия, которая, как уже было сказано, имеет ряд побочных эффектов, искажающих результаты опыта (Müller-Redetzky et al., 2012; Lewis et al., 2016). Вид выбранного животного также влияет на способ введения бактерий. Например, мыши и крысы не имеют кашлевых рефлексов, что делает назальный путь особенно актуальным вариантом заражения этих видов. Напротив, у морских свинок отмечен выраженный кашлевой рефлекс, и это объясняет необходимость использования внутритрахеального или аэрозольного способов (Hraiech et al., 2015). Так как грызуны имеют высокую устойчивость к патогенам, в рассматриваемых моделях часто прибегают к иммуносупрессии для увеличения восприимчивости животного к инфекции. Применение иммуносупрессивных препаратов из-за их побочных действий на организм значительно осложняет интерпретацию результатов опытов (Hraiech et al., 2015). Наиболее простым вариантом инфицирования дыхательных путей является интраназальный путь. Мышей на короткий промежуток времени вводят в наркоз и, фиксируя в вертикальном положении, вводят им в ноздри бактериальную культуру в объеме 5–50 мкл. Если вводить объем менее 5 мкл, то культура оседает на уровне верхних дыхательных путей, не поступая в нижние отделы. Введение более 50 мкл культуры может привести к гибели животного из-за удушья. Основным ограничением данного пути инокуляции бактерий является неточность дозировки микроорганизмов, попадающих в легкие, поскольку часть культуры бактерий может попасть в пищевод и нижележащие отделы желудочно-кишечного тракта (Hraiech et al., 2015). Для предотвращения этого и введения точного количества микроорганизмов был предложен интратрахеальный способ. Его техника состоит в интубации трахеи или выполнении трахеотомии. Ограничением модели является хирургическое вмешательство под общим наркозом, возможные послеоперационные осложнения, а также то, что интубационный способ не обеспечивает получения равномерного развития воспаления в зонах и сегментах легких (Mizgerd, Skerrett, 2008; Hraiech et al., 2015). Для аэрозольного заражения необходимо дорогостоящее оборудование — специальные камеры с распылителями. Хотя вдыхание аэрозолей с микроорганизмами приводит к более равномерному распределению бактерий в легких, частицы аэрозолей оседают в верхних дыхательных путях, на коже, на поверхности глаз, попадают при распылении и в желудочно-кишечный тракт. Также есть культуры микроорганизмов, которые наиболее чувствительны к высыханию, к примеру, *S. pneumoniae*. Приборы для аэрозольной модели

требуют постоянной калибровки, регулярного обслуживания и тестирования. Кроме того, данный вариант моделирования представляет биологическую опасность для персонала. Упомянутые выше способы заражения приводят в основном к острой форме пневмонии. Если же культуры муконидных штаммов *P. aeruginosa* вводить в альгинатных шариках, то это влечет за собой формирование биоопленок и хроническое течение инфекции (Hraiech et al., 2015). В исследованиях применяют также модели с так называемыми двумя ударами, которые имитируют клиническое течение сепсиса у человека как осложнение после абдоминального сепсиса или травмы. Для этого на мышах моделируют лигирование и прокол стенки слепой кишки, далее — через 72 ч — одной группе животных вводят интраназально бактериальную суспензию *Pseudomonas aeruginosa*, а животным другой группы — суспензию *Streptococcus pneumoniae*. В срезах легких контрольных мышей, которым была произведена операция лигирования и прокола слепой кишки, регистрировали инфильтрацию интестина мононуклеарами и полиморфноядерными лейкоцитами, при этом альвеолярные перегородки не были уплотнены и не было кровоизлияний. В легких обеих групп подопытных животных были выявлены обширные очаги мононуклеарной и полиморфноядерной лейкоцитарной инфильтрации, утолщение альвеолярных перегородок и кровоизлияния. При этом в модели с использованием *Pseudomonas aeruginosa* отмечено диффузное поражение легких, смертность регистрировалась начиная с 24 ч после введения бактерий и достигала максимума через 3 дня. В модели с применением *Streptococcus pneumoniae* поражение легких было более локальным, а смертность животных — более отсроченной. Таким образом, в приведенных исследованиях были продемонстрированы различия в течении и морфологических особенностях сепсиса в зависимости от вида инфекционного агента (Muenzer et al., 2006; Lewis et al., 2016).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование сепсиса на животных, безусловно, вносит значительный вклад в изучение патогенетических звеньев и закономерностей сепсиса. Благодаря моделированию найдены новые биомаркеры сепсиса, улучшены схемы терапии, получена дополнительная информация о фармакокинетике, токсичности и механизме действия разных препаратов. Несмотря на то, что существует множество ограничений, относящихся к каждому из рассмотренных вариантов моделей, целесообразно использовать разные формы моделирования на разных видах животных, ибо при сопоставлении результатов этих опытов могут

быть найдены общие (следовательно, объективные) критерии патогенеза сепсиса.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Андреевская С.Г., Черкасова М.Н. Гистологические изменения печени и почек при экспериментальном сепсисе в аспекте специфики строения их микроциркуляторного русла // Патогенез. 2017. Т. 15. № 4. С. 32–37.
- Корнеев К.В. Мышинные модели сепсиса и септического шока // Мол. биол. 2019. Т. 53. № 5. С. 799–814.
- Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2015. Т. 17 (3). С. 170–186.
- Любимов Г.Ю., Любимов А.Г., Козлов В.А. Влияние обработанных зимозаном нейтрофилов на рост меланомы B16 в печени и селезенке мышей // Рос. иммунол. журнал. 2016. Т. 10 (19). № 1. С. 81–87.
- Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение / Ред. Б.Р. Гельфанд. М.: МИА, 2017. 408 с.
- Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Бойчук С.В. Патолофизиология неонатального сепсиса // Вестн. соврем. клин. мед. 2014. Т. 7. № 6. С. 97–104.
- Черкасова М.Н., Жуховицкий В.Г., Боровая Т.Г. Сравнительная характеристика белой пульпы селезенки в экспериментальных моделях сепсиса, вызванного разными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Бюл. эксперим. биол. мед. 2020. Т. 170. № 7. С. 57–60.
- Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммунотерапевтических воздействий при лечении сепсиса // Мед. иммунол. 2001. Т. 3. № 3. С. 415–429.
- Abdullahi A., Amini-Nik S., Jeschke M.G. Animal models in burn research // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71 (17). P. 3241–3255.
- Belikoff B., Buras J.A. A practical approach to animal models of sepsis // Sourcebook of models for biomedical research / Ed. P.M. Conn. Totowa: Humana Press, 2008. P. 473–482.
- Buras J.A., Holzmann B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage // Nat. Rev. Drug Discov. 2005. V. 4. P. 854–865.
- Chen P., Stanojic M., Jeschke M.G. Differences between murine and human sepsis // Surg. Clin. North Am. 2014. V. 94 (6). P. 1135–1149.
- Cherkasova M., Zhukhovitsky V., Borovaya T. The growth dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from peritoneal fluid, blood and homogenates of the organs

- of septic mice // Abstract book 30<sup>th</sup> European congress of clinical microbiology and infectious diseases. 2020. Abstract 7897. P. 3776.
- Copeland S., Warren H.S., Lowry S.F. et al. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005. V. 12. P. 60–67.
- Dahiya P. Burns as a model of SIRS // Front. Biosci. 2009. V. 14 (1). P. 4962.
- Dai T., Kharkwal G.B., Tanaka M. et al. Animal models of external traumatic wound infections // Virulence. 2011. V. 2 (4). P. 296–315.
- Delano M.J., Scumpia P.O., Weinstein J.S. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis // J. Exp. Med. 2007. V. 204 (6). P. 1463–1474.
- Engel J., Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12 (1). P. 61–66.
- Guillon A., Preau S., Aboab J. et al. Preclinical septic shock research: why we need an animal ICU // Ann. Intens. Care. 2019. V. 9 (1). P. 66.
- Hajjar A.M., Ernst R.K., Tsai J.H. et al. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications // Nat. Immunol. 2002. V. 3 (4). P. 354–359.
- Hamerly T., Everett J.A., Paris N. et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* biomarkers from thermally injured mice *in situ* using imaging mass spectrometry // Anal. Biochem. 2017. V. 539. P. 144–148.
- Haouzi P. Murine models in critical care research // Crit. Care Med. 2011. V. 39 (10). P. 2290–2293.
- Haouzi P., van de Louw A. Uncoupling mitochondrial activity maintains body VO<sub>2</sub> during hemorrhage-induced O<sub>2</sub> deficit in the anesthetized rat // Respir. Physiol. Neurobiol. 2013. V. 186. P. 87–94.
- Haynes A. 3rd, Ruda F., Oliver J. et al. Syndecan 1 shedding contributes to *Pseudomonas aeruginosa* sepsis // Infect. Immun. 2005. V. 73 (12). P. 7914–7921.
- Hellman J., Bahrami S., Boros M. et al. Part III: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for fluid resuscitation and antimicrobial therapy endpoints // Shock. 2019. V. 51 (1). P. 28–38.
- Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis // New Eng. J. Med. 2003. V. 348. P. 138–150.
- Hraiech S., Papazian L., Rolain J., Bregeon F. Animal models of polymicrobial pneumonia // Drug Des. Devel. Ther. 2015. V. 9. P. 3279–3292.
- Jiang L.I., Sternweis P.C., Wang J.E. Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation // Mol. Immunol. 2013. V. 54 (1). P. 14–22.
- Kennedy E.A., King K.Y., Baldrige M.T. Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 1534.
- Kingsley S.M., Bhat B.V. Differential paradigms in animal models of sepsis // Curr. Infect. Dis. Rep. 2016. V. 18 (9). P. 26.
- Lewis A.J., Seymour C.W., Rosengart M.R. Current murine models of sepsis // Surg. Infect. 2016. V. 17 (4). P. 385–393.
- Liang X., Lin T., Sun G. et al. Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages // J. Leukoc. Biol. 2009. V. 86 (2). P. 229–235.
- Libert C., Ayala A., Bauer M. et al. Part II: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for types of infections and organ dysfunction endpoints // Shock. 2019. V. 51 (1). P. 23–32.
- Lindenblatt N., Menger M.D., Klar E. et al. Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. V. 289 (6). P. H2680–H2687.
- Maier S., Traeger T., Entleutner M. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis // Shock. 2004. V. 21 (6). P. 505–511.
- Minasyan H. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient // Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med. 2019. V. 27. P. 19.
- Mizgerd J.P., Skerrett S.J. Animal models of human pneumonia // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2008. V. 294 (3). P. L387–L398.
- Municio C., Alvarez Y., Montero O. et al. The response of human macrophages to  $\beta$ -glucans depends on the inflammatory milieu // PLoS One. 2013. V. 8 (4). P. e62016.
- Murando F., Peloso A., Cobianchi L. Experimental abdominal sepsis: sticking to an awkward but still useful translational model // Mediators Inflamm. 2019. V. 2019. P. 8.
- Mora-Rillo M., Fernández-Romero N., Navarro-San Francisco C. et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia // Virulence. 2015. V. 6 (1). P. 93–100.
- Maier S., Traeger T., Entleutner M. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis // Shock. 2004. V. 21 (6). P. 505–511.
- Muenzer J.T., Davis C.G., Dunne B.S. et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture // Shock. 2006. V. 26. P. 565–570.
- Mutlak H., Jennewein C., Tran N. et al. Cecum ligation and dissection: a novel modified mouse sepsis model // J. Surg. Res. 2013. V. 183 (1). P. 321–329.
- Müller-Redetzky H., Suttorp N., Witzenzrath M. Experimental models of pneumonia-induced sepsis // Drug Discov. Today Dis. Models. 2012. V. 9 (1). P. e23–e32.
- Nemzek J.A., Hugunin K.M., Opp M.R. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being // Comp. Med. 2008. V. 58 (2). P. 120–128.
- Nielsen J.S., Larsson A., Rix T. et al. The effect of activated protein C on plasma cytokine levels in a porcine model of acute endotoxemia // Intens. Care Med. 2007. V. 33 (6). P. 1085–1093.
- Osuchowski M.F., Ayala A., Bahrami S. et al. Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis // Shock. 2018. V. 50 (4). P. 377–380.
- Ogunniyi A.D., Kopecki Z., Hickey E.E. et al. Bioluminescent murine models of bacterial sepsis and scald wound infections for antimicrobial efficacy testing // PLoS One. 2018. V. 13 (7). P. e0200195.
- Park B.S., Lee J.O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes // Exp. Mol. Med. 2013. V. 45 (12). P. e66.

- Park P.W., Foster T.J., Nishi E. et al. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin and  $\beta$ -toxin // J. Biol. Chem. 2003. V. 279 (1). P. 251–258.
- Pereira C.T., Herndon D.N. The pharmacologic modulation of the hypermetabolic response to burns // Adv. Surg. 2005. V. 39. P. 245–261.
- Poli-de-Figueiredo L.F., Garrido A.G., Nakagawa N. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance // Shock. 2008. V. 11 (1). P. 53–59.
- Popov D., Pavlov G. Sepsis models in experimental animals // Trakia J. Sci. 2013. V. 1. P. 13–23.
- Qu M., Nourbakhsh M. Current experimental models of burns // Discov. Med. 2017. V. 23. P. 95–103.
- Radermacher P., Haouzi P. A mouse is not a rat is not a man: species-specific metabolic responses to sepsis – a nail in the coffin of murine models for critical care research? // Intens. Care Med. Exp. 2013. V. 1 (1). P. 26.
- Ramakers B.P., Riksen N.P., van den Broek P. et al. Circulating adenosine increases during human experimental endotoxemia but blockade of its receptor does not influence the immune response and subsequent organ injury // Crit. Care. 2011. V. 15 (1). P. R3.
- Remick D.G., Newcomb D.E., Bolgos G.L. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture // Shock. 2000. V. 13 (2). P. 110–116.
- Reyes R.E., González C.R., Jiménez R.C. et al. Mechanisms of O-antigen structural variation of bacterial lipopolysaccharide (LPS) // The complex world of polysaccharides / Ed. D.N. Karunaratne. Rijeka: IntechOpen, 2012. P. 71–98.
- Schaber J.A., Triffo W.J., Suh S.J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling // Infect. Immun. 2007. V. 75 (8). P. 3715–3721.
- Sondhi P., Maruf M.U., Stine K.J. Nanomaterials for biosensing lipopolysaccharide // Biosensors. 2019. V. 10 (1). P. 2.
- Stortz J.A., Raymond S.L., Mira J.C. et al. Murine models of sepsis and trauma: can we bridge the gap? // ILAR J. 2017. V. 58 (1). P. 90–105.
- Uhlig C., Krause H., Koch T. et al. Anesthesia and monitoring in small laboratory mammals used in anesthesiology, respiratory and critical care research: a systematic review on the current reporting in top-10 impact factor ranked journals // PLoS One. 2015. V. 10 (8). P. e0134205.
- Vaure C., Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species // Front. Immunol. 2014. V. 5. P. 316.
- Volman T.J., Hendriks T., Goris R.J. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome // Shock. 2005. V. 23 (4). P. 291–297.
- Wichterman K.A., Baue A.E., Chaudry I.H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal // J. Surg. Res. 1980. V. 29 (2). P. 189–201.
- Wong V.W., Sorkin M., Glotzbach J.P. et al. Surgical approaches to create murine models of human wound healing // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 969618.
- Wynn J.L., Scumpia P.O., Delano M.J. et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis // Shock. 2007. V. 28 (6). P. 675–683.
- Zambricki E.A., Daley L.G. Rat sex differences in anesthesia // Comp. Med. 2004. V. 54. P. 49–53.
- Zantl N., Uebe A., Neumann B. et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis // Infect. Immun. 1998. V. 66 (5). P. 2300–2309.
- Zingarelli B., Coopersmith C.M., Drechsler S. et al. Part I: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS) for study design and humane modeling endpoints // Shock. 2019. V. 51 (1). P. 4–17.

## On the Problem of Experimental Modeling of Sepsis

M. N. Cherkasova\*

Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology,  
Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

\*e-mail: mari.cherkasova.1991@bk.ru

Four variants of experimental models of sepsis are discussed: injection, surgical, burn, models of pneumonia with the transition to sepsis. The positive and negative aspects of each of them are analyzed. It is noted that the optimal choice of animals is the most important condition for successful modeling of sepsis. Some aspects of anatomy, physiology, and immunology peculiar to a particular mammalian species are considered. Taking into account the existing differences in reactions, it is possible to note the complexes of signs that are similar or identical in different representatives of animals in sepsis. However, despite the limitations that apply to each sepsis model, it is advisable to use different models on different animal species. Comparison and comparison of the results obtained in the course of experiments is extremely important for elucidating the pathogenetic criteria of sepsis.

**Keywords:** model, sepsis, endotoxin, strain, pathogenesis



УДК 576.522

## УДАЛЕННЫЕ СИНЦИТИИ АНАСТОМОЗОВ СМЕЖНЫХ НЕЙРОНОВ

© 2021 г. О. С. Сотников<sup>1,\*</sup>, Л. А. Давыдова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт–Петербург, Россия

<sup>2</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

\*e-mail: ossotnikov@mail.ru

Поступила в редакцию 05.10.2020 г.

После доработки 28.01.2021 г.

Принята к публикации 27.02.2021 г.

Описанные ранее межнейронные волоконные несинаптические связи обычно рассматривались как комиссуральные, а их появление гипотетически связывалось не с обычным, а часто с повторным делением ядер нейронов и ростом связывающих их нейритов. Цель нашей работы состояла в пересмотре этой нейробиологической гипотезы, основанной на фиксированных препаратах, с позиций кинетики живых нейронов. С помощью видеосъемки было показано, что двуядерные нейроны образуются не путем деления клеток, а с помощью слияния двух их нервных отростков и тел. Показано, что ток аксоплазмы — не жидкость, а сократимый гель, который, сокращаясь, сближает клетки, вплоть до их слияния. Стало ясно, что фрагменты соединяющих волокон являются не просто комиссуральными отростками, а представляют собой трубчатую, электрически и тинкториально пронизываемую, ретрагирующую систему — анастомоз. Как всякий анастомоз, эта структура имеет две концевые перфорации, то есть является дистантным синцитием. Эти данные теперь позволяют считать нейриты не как исключение общебиологического закона об общих основных свойствах клеток Ранвье. Такой синцитий описан впервые только у отростчатых клеток. Поэтому нами проанализированы монографии классика нейрогистологии Сантьяго Рамон-и-Кахаль. В работах автора были обнаружены повсеместные множественные, неопознанные им ранее, дистантные анастомозы, которые, по нашему мнению, должны существенно влиять на электрические свойства нейронов и нуждаются в дополнении общебиологической теории нервной системы многоклеточных животных.

**Ключевые слова:** нейрональные анастомозы, комиссуральная связь нейронов, слияние нервных отростков, ток аксоплазмы, двуядерные клетки

**DOI:** 10.31857/S0042132421040074

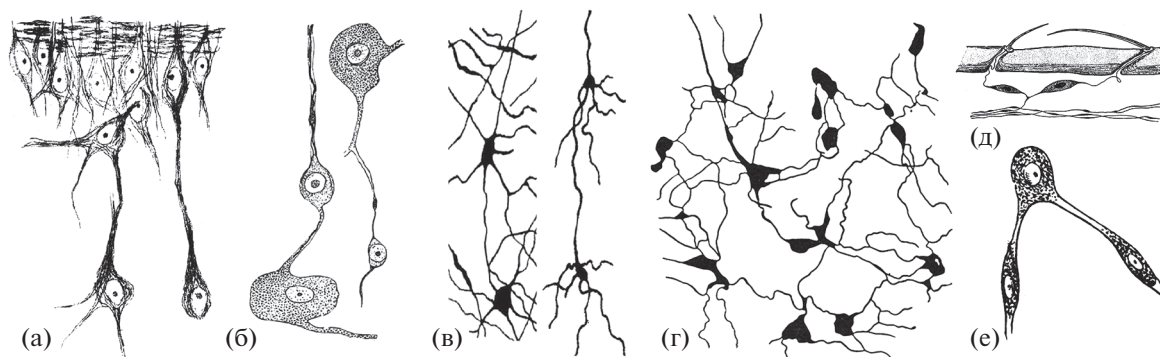
### ВВЕДЕНИЕ

Трудно себе представить, что при современной световой микроскопии можно было увидеть, открыть какую-то новую неизведанную морфологическую структуру и ее функцию. Действительно, нейроны с одиночными короткими и утолщенными ветвями, соединяющими два тела клетки, были известны еще Рудольфу Вагнеру (Wagner, 1854). Но это была уникальная единичная редкость, как считалось, “уродливый артефакт”, не представляющий интереса для науки и практики. Однако число описаний так называемых комиссур увеличивалось и обратило на себя внимание многих морфологов (рис. 1). Но факты оказались непризнанными. Знаменитый испанский нейрогистолог Сантьяго Рамон-и-Кахаль — основоположник “Нейронной теории” не придавал значения этим, якобы случайным, находкам. Но теперь этот феномен обнаружен у всех видов многоклеточных: у млекопитающих и человека, у

моллюсков, раков, у насекомых и у кишечнополостных. Причем, такие нервные отростки, связывающие тела нейронов, встречаются в ядрах мозга, в сетчатке, в ганглиях кишечника и других органах нервной системы.

### ОБЩЕБИОЛОГИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА О РЕГЕНЕРАЦИИ МНОГОЯДЕРНЫХ НЕЙРОНОВ

В 1972 г. появились обширные исследования венесуэльских нейрогистологов (Sosa J.M., Sosa H.M.S., 1972). Они продемонстрировали короткую комиссуральную волоконную связь многих двух- и трехнейронных нервных клеток. Их препараты, по нашему мнению, опровергают прежние представления о том, что такие связи отсутствуют в ЦНС. Они формулируют гипотезу о том, что межнейронные комиссуры являются результатом “простого”, многократного расщепления ядер



**Рис. 1.** Многочисленные комиссуральные связи нейронов у животных разного вида. а — нейрональные связи пирамидных клеток амонаго рога (Дойников, 1955); б — связь отростков нейронов симпатического узла тритона разного диаметра (Лавдовский, Овсянников, 1887); в — соединенные комиссурами нейроны мозжечка (van Gehuchten, 1891); г — множественные синцитиальные связи в сети нервной системы речного рака (Tonner, 1933); д — слившиеся отростки сенсорных нейронов стрекозы (Заварзин, 1941); е — три комиссурально связанных нейрона сетчатки человека (по: Келликер, 1865).

(амитоза), без стадий митоза, с постепенным расхождением клеток и одновременным вытягиванием связующего цитоплазматического мостика, образовавшегося между нейронами. Сходного распространенного мнения современных исследователей о формировании комиссур придерживались ранее Гензен, Бете и Дорн. Однако на отличных препаратах (Sosa J.M., Sosa H.M.S., 1972), как, в принципе, на любых фиксированных препаратах в статике, описанный авторами гипотетический процесс наблюдать невозможно. Кроме того, классический амитоз предполагает наличие митоза без цитокинеза, а авторы дважды подчеркивают, что митоза “ни разу не встречали”. Сходные представления о возможном “расщеплении” и расхождении ядер одной клетки высказывались многими авторами и неоднократно в качестве новой, повторной функции зрелого нейрона. Такие гипотетические представления широко известны и сейчас (Blümcke, Wiestler, 2002; Hirohata, 2008; Zhu et al., 2008; Kawataki et al., 2010; Joyon et al., 2016 и др.). Нам известны 76 статей сторонников амитоза. Многие из них даже не обсуждают возможность слияния отростков и тел нейронов.

Цель наших видеоисследований состояла в том, чтобы продемонстрировать, что описанные короткие межнейронные внесинаптические связи являются не просто комиссурами, а представляют собой полые цилиндрические образования, заполненные сократимым гелем, электрически и тинкториально проницаемой субстанцией — анастомозами, то есть своеобразными дистантными цитоплазматическими синцитиями с двумя перфорациями, по одной на каждой клетке. Ставилась задача выявить у нейронов их прижизненные общебиологические свойства: подвижность, цитоплазматическую адгезивность и нейрональ-

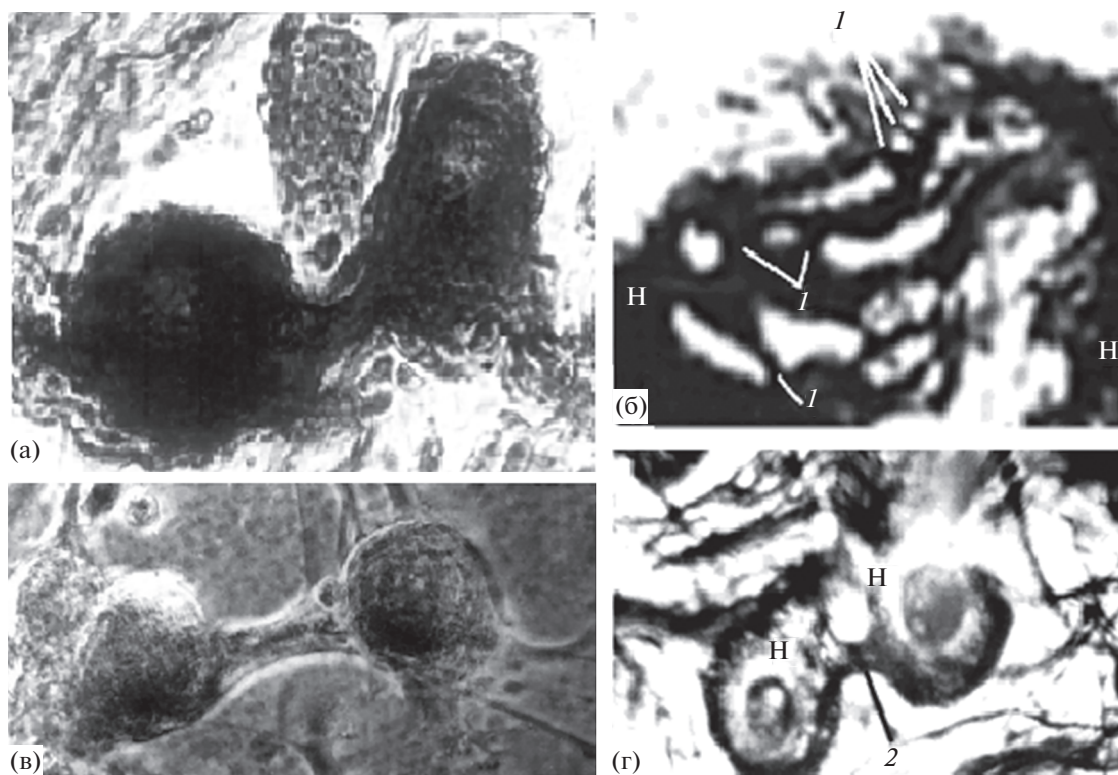
ное мембранное слияние. Чтобы опровергнуть случайность находок таких синцитиальных анастомозов, следовало проанализировать результаты многочисленных монографий знаменитых исследователей мозга — Рамон-и-Кахал и его сторонников, отрицавших возможность межнейронных цитоплазматических связей. В результате, мы стремились обосновать возможность существования и в нервной системе не только уникальных химических синапсов, но и распространенной у всех других клеток общебиологической синцитиальной цитоплазматической связи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Импрегнация фиксированных препаратов*

Объект исследования: каудальный брыжеечный узел взрослых животных (38 собак).

При исследовании применена методика импрегнции 2%-ным раствором азотнокислого серебра по Рассказовой. Для гистологических исследований узлы брали у животных, находящихся под эфирным наркозом, чтобы предотвратить аутолиз и уменьшить время нарушения кровоснабжения ганглия. Материал, предназначенный для импрегнции, фиксировали в 12%-ном растворе нейтрального формалина. Срезы изготавливали толщиной 20–30 мкм на замораживающем микротоме. Часть срезов дополнительно обрабатывали 0.2%-ным раствором золотоклоридной кислоты. Названными методами выявляли гистологическую структуру ганглия: нервные клетки, их отростки, нервные волокна и межнейрональные связи.



**Рис. 2.** Комиссурально связанные нейроны фиксированного каудального брыжеечного узла нейронов собаки и живые связанные нейроны моллюска.

а, г — утолщенные, одиночные комиссуры спаренных нейронов, как гипотеза незавершенного деления нейронов (амитоз); б — протоплазматические мостики спаренных нервных отростков; в — живые спаренные нейроны в культуре ткани; 1 — цитоплазматические мостики разного размера, связывающие нервные отростки; 2 — межклеточные утолщенные комиссуры; Н — тело нейрона; а, б, г — импрегнация азотнокислым серебром по Рассказовой; в — прижизненная фазово-контрастная видеомикроскопия. Об. 40Ph, ок. 10.

### *Структурная динамика живых нейронов*

Для культивирования клеток взрослых моллюсков (80 животных) использовали специальные микрокамеры. Среду для культивирования готовили на основе маточной однократной среды RPMI-1640 путем разведения ее стерильным физиологическим раствором (ммоль): 75 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 2.5 MgCl<sub>2</sub>. Для стерилизации среду фильтровали, пропуская ее через миллипоровые мембраны с диаметром пор 0.22 мкм с помощью Peristaltic Miniflon Pump 304 (Польша). При фильтрации среды она достигала оптимального для культивирования значения pH — 7.8. Трансмиссионная микроскопия осуществлялась с помощью инвертированного фазово-контрастного видеомикроскопа МБИ-13 (ЛОМО). Использована видеокамера DCM310 (USB2.0).

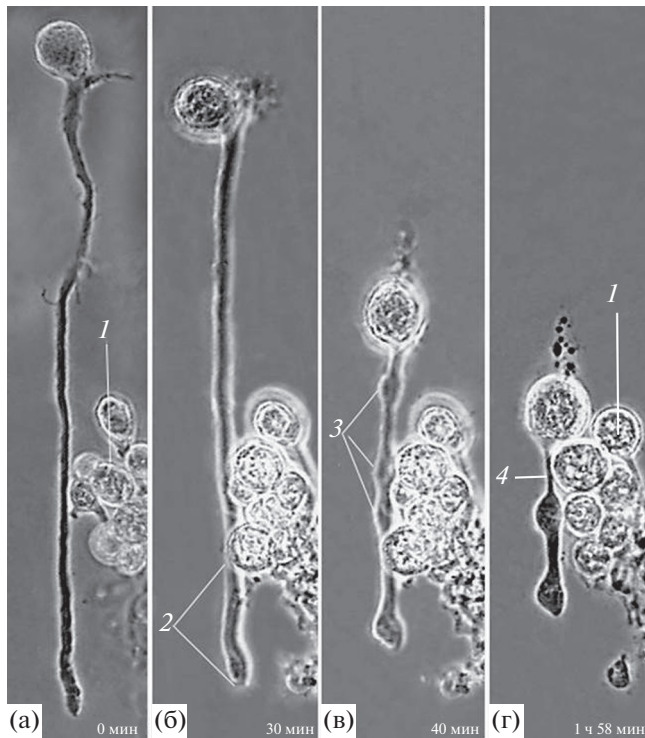
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Статическая морфология парных нейронов, соединенных комиссурами*

Современная классическая нейроморфология, вслед за блестящими работами Рамон-и-Ка-

халю, основанными на импрегнационных методах серебрения, исследовала многие детали строения ЦНС и ПНС (рис. 2). Эта методика открыла сущность обширной интеграционной взаимосвязи клеток нервной системы. Но ее естественным недостатком было то, что она допускала анализ только посмертных гистологических препаратов. Морфологическая функция, кинетика живых нейронов в значительной мере, поэтому, оставалась неизученной. Оказалось, что использование прижизненной фазово-контрастной микроскопии и видеосъемки открывает новые структурные и физиологические свойства препаратов. На рис. 2а, 2б, 2г четко видны толстые, одиночные, комиссурально связанные нейроны. Эти препараты никак не соответствуют предположению амитоза нейронов. Как отмечалось выше, это неподвижные фиксированные статические структуры. У них нет фигур митоза и деления клеток, реально нет движения, нет кинетики. Поэтому мы решили к прежним гистологическим препаратам присовокупить динамику поведения живых нейронов, выявленную с помощью видеосъемки, то есть, фактически, показать картину морфологической физиологии нейрона.





**Рис. 3.** Перемещение массы аксоплазмы в двух противоположных направлениях (к соме и к концу волокна). Движение концов препарата — противоположное. а–г — стадии процесса; 1 — область адгезии волокна, образованная дополнительными клетками; 2 — медленная скорость сокращения аксоплазмы на периферическом конце препарата; 3 — варикозная деформация аксона; 4 — истончение массы аксоплазмы посередине препарата в результате движения аксоплазмы в оба конца от центральной точки адгезии. Прижизненная микроскопия. Фазовый контраст. Серийная фазовоконтрастная видеосъемка. Об. 40Ph, ок. 10.

#### *Движение аксоплазмы — доказательство анастомоза*

Прежде всего, оказалось, что аксоплазма — это не жидкость, а водный гель, который способен сокращаться в обе противоположные стороны одновременно (рис. 3). Следовательно, такие межклеточные отростки необходимо именовать не как комиссуры, а как интернейрональные цитоплазматические анастомозы, особые короткие, утолщенные, одиночные структуры, позволяющие току аксоплазмы смещаться вдоль нейритов и осуществлять электрофизиологическую и тинкториальную взаимосвязь клеток.

#### *Общебиологическое свойство адгезии и слияния живых нервных клеток*

Важно продемонстрировать, что анастомозы образуются не путем амитоza, а в результате слия-

ния волокон “конец-в-конец” (рис. 4а). Слияние “конец-в-бок” (рис. 4б) как бы блокирует видимую внешнюю регенерацию, но движение аксоплазмы продолжает перемещаться, причем в обе стороны от контакта слияния двух волокон. Как у всякой трубчатой структуры, у наших анастомозов существуют два отверстия, которые и являются дистантными синцитиальными межклеточными перфорациями.

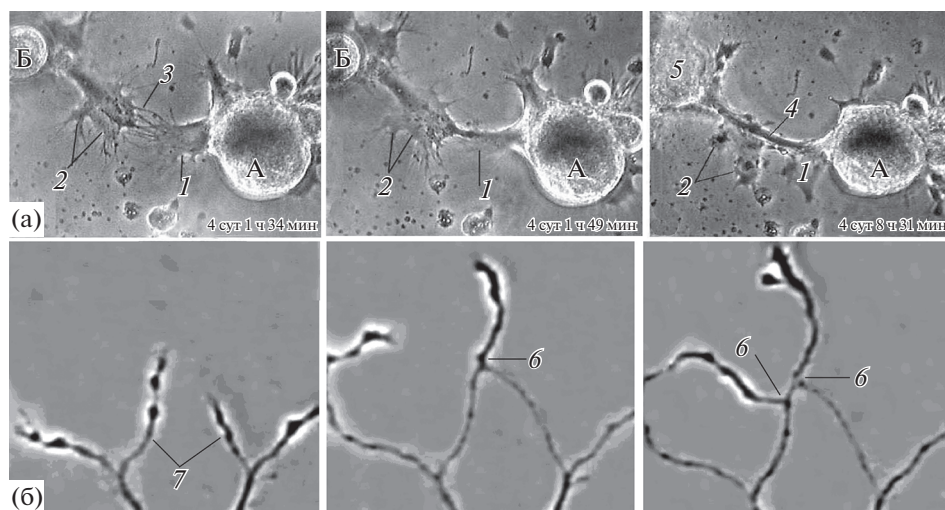
Именно цитоплазматические слияния смежных волокон соединяют два нейрона, а анастомоз между ними, сокращаясь и впячиваясь в сомы клеток, превращается в дистантные синцитии (рис. 5).

Известно, что синцитий как самостоятельная структура существует у всех типов клеток. Но по предположению общебиологической НЕЙРОНАЛЬНОЙ ТЕОРИИ, нейроны не содержат синцитиев, что отличает их от ненервных клеток. Особенность представленного нами нервного синцития состоит в том, что он образуется у клеток с разветвленной арборизацией, поэтому мембранная адгезия чаще реализуется между нервными волокнами, а не между телами клеток. В этом уникальность описанной структуры и причина того, что она долгое время оставалась незамеченной в густых нервных сплетениях. Возможно поэтому, она не отмечена ни в монографиях нейронистов, включая Рамон-и-Кахаля, ни в трудах ретикуляристов — сторонников Камилло Гольджи.

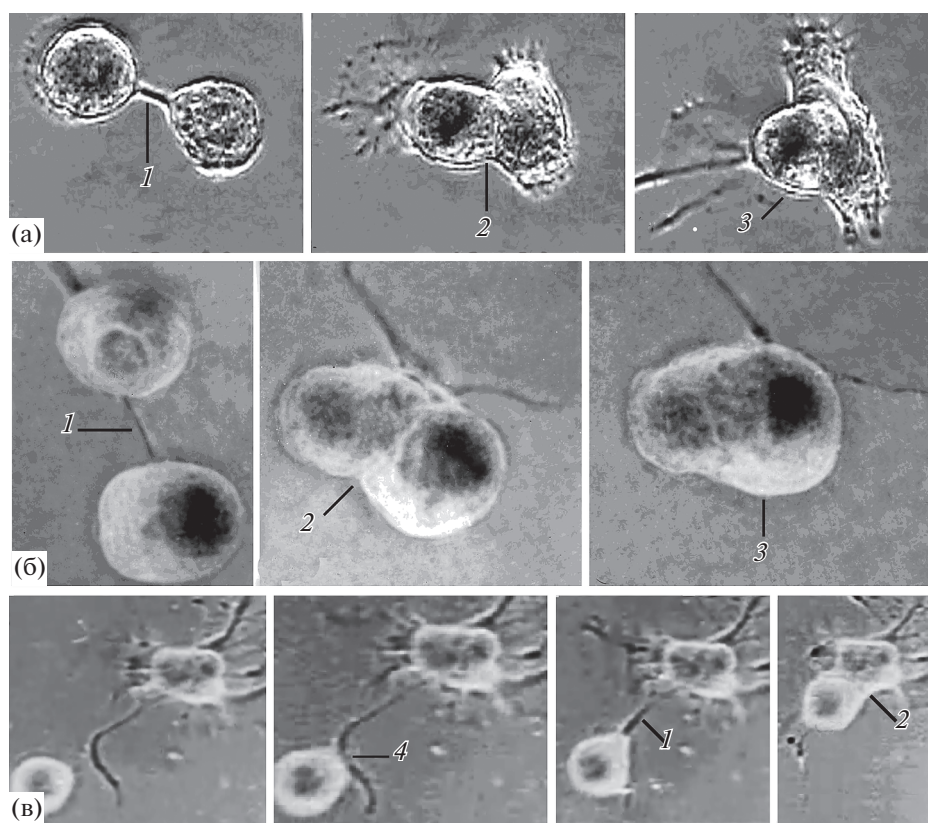
## ОБСУЖДЕНИЕ

### *Обоснование свойств дистантных синцитиев*

Таким образом, малозаметная и безымянная, предполагаемая многими как элемент амитоza, волоконная комиссура предстает как неопознанная ранее органелла: толстый, одиночный, короткий, неветвистый сегмент нервного волокна, являющийся анастомозом, заполненным подвижной аксоплазмой, который сокращается, сближая тела нейронов вплоть до их контактов и слияния. Главным отличием этой структуры, видимо, является ее образование путем адгезии, ретракции и слияния смежных нервных отростков между собой или с телом клетки и формирование анастомоза двух дистантных мембранных фибросоматических синцитиев, связывающих электрически и тинкториально оба тела нейрона. Особенностью этой структуры является то, что она подобна электрическому синапсу, обладает крайне низким электрическим сопротивлением, проводит нервный импульс от обоих синцитиальных концов и пропускает ток в двух противоположных направлениях.

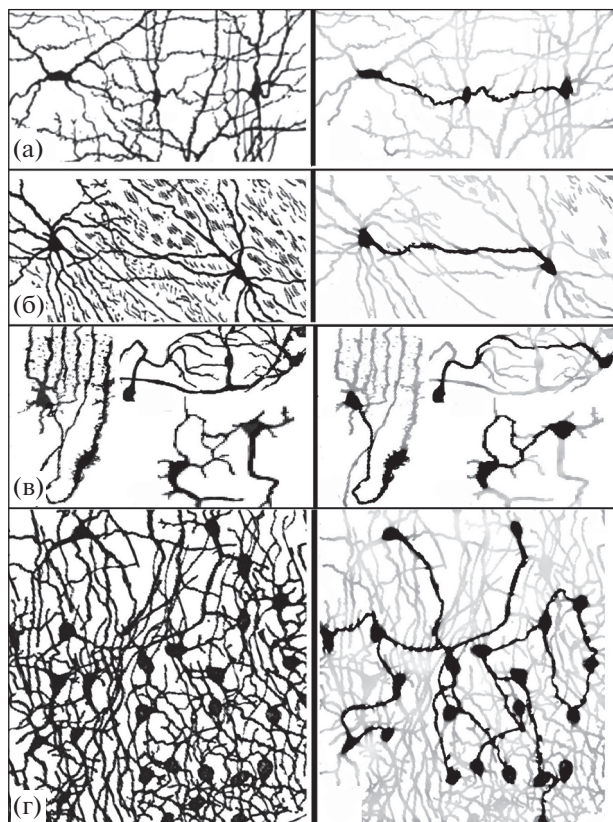


**Рис. 4.** Синцитиальное слияние нервных отростков с образованием кольцевидных анастомозов. а — слияние нервных отростков “конец-в-конец”; б — слияние нервных отростков “конец-в-бок”; 1 — отросток нейрона А; 2 — ламеллярный отросток нейрона Б; 3 — соединенные филоподии конусов роста клеток А и Б перед слиянием их ламеллярных отростков; 4 — формирующаяся единая цитоскелетная аксиальная структура, проникающая в ламеллоподии обеих клеток; 5 — поврежденный нейрон; 6 — синцитиальное образование сливающихся отростков; 7 — регенерирующие нейриты. Культура нейронов. Прижизненная видеомикроскопия. Фазовый контраст. Об. 20Ph, ок. 10.



**Рис. 5.** Сближение и синцитиальное слияние нейронов в результате ретрактивной подвижности аксоплазмы их анастомозов. а — синцитиальный анастомоз сближает тела нейронов, регенерирующие отростки и общее передвижение дикариона; б — кинетика формирования дистантного синцития в результате ретракции аксоплазмы и слияния двух тел нейронов; в — слияние отростка с другим телом клетки, ретракция отростка и контакт тел двух нейронов перед слиянием; 1 — синцитиальный анастомоз двух нейронов; 2 — синцитиальная связь двух нейронов; 3 — дикарион; 4 — слияние тела в бок отростка. Культура ткани. Прижизненная видеомикроскопия. Фазовый контраст. Об. 20Ph, ок. 10.





**Рис. 6.** Синцитиальные межнейронные анастомозы нервных препаратов из книги “Гистология нервной системы человека и позвоночных” (Ramon y Cajal, 1911), и те же демаскированные препараты с уменьшенной интенсивностью неконтактирующих арборизаций. а, б — мозг кошки; в — обонятельные нейроны и кольцевые синцитиальные анастомозы затылочного отдела мозга мыши; г — промежуточный мозг крысы. Импрегнация на основе “черной реакции” Гольджи.

#### *Сравнение электрических синапсов и синцитиев*

Еще в 1959 г. Фёршпан и Поттер (Furshpan, Potter, 1959) физиологически доказали возможность электрической взаимосвязи между нейронами, минуя медиаторные синапсы. С тех пор, исследование электрических синапсов приобрело большую популярность (Сотников, 2019; Сергеева и др., 2020; Nagy et al., 2019; Peng et al., 2019). Было установлено увеличение численности одиночных электрических синапсов при патологии (Belousov, 2012; Belousov, Fontes, 2013). Удалось продемонстрировать также механизм превращения электрических синапсов в одиночные синцитии (Сотников, 2019). Наконец, в этой статье мы впервые попытались продемонстрировать новый биологический феномен сдвоенных дистантных синцитиальных анастомозов.

Утверждая новую структуру и ее значение для нейрона, необходимо продемонстрировать полноценное, четкое, статическое, морфологическое описание, доказать на живых нейронах механизм возможного функционирования структуры. Мы впервые попытались продемонстрировать все эти свойства предполагаемой новой структуры — дистантного анастомоза. Отсутствие всех этих условий в прошлом возможно и не позволяло реализовать и осмыслить указанную структуру необычного синцития. Основным недостатком обоснования дистантных синцитиальных межнейронных анастомозов могло считаться отсутствие доказательств значительного числа этих структур, полученных одним исследователем однотипным методом.

#### *Неожиданные доказательства дистантных синцитиев в книгах Рамон-и-Кахаль*

Мы считали возможным найти доказательства синцитиев при анализе многочисленных прекрасных трудов самого великого Рамон-и-Кахаль, который требовал от ретикуляристов массовости доказательства наличия цитоплазматической связи нейронов (Ramon y Cajal, 1954). Для этого, мы проанализировали иллюстрации давно опубликованных и уже неоднократно цитированных монографий Кахаль. Чтобы уменьшить естественную маскировку запутанных нервных сплетений в мозге, был использован метод демаскирования, позволяющий снизить оптическую плотность тонких второстепенных нервных ветвей, оставляя четкими только истинные, утолщенные межклеточные связи (рис. 6). Анализ каждой из 10 иллюстраций книги выявил массу, ранее скрытых в нервных сплетениях мозга, дистантных синцитиальных анастомозов, соединяющих чаще два, но иногда до пяти и более нейронов. Авторы считают, что этим методом, с помощью препаратов Кахаль, выполнено требование об убедительном количестве дистантных синцитиев в нервной системе.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Наши исследования вносят существенное и важное дополнение к великой НЕЙРОННОЙ ТЕОРИИ. Впервые обнаруживаются, помимо химических и электрических синапсов, новые общебиологические структуры — дистантные двойные межклеточные синцитии аксоплазмы. Выявлено, что аксоплазма — это не жидкость, а сократимый гель, который ретрагирует в обе противоположные стороны одновременно и обязательно. Нервные сети формируются только

путем синцитиального слияния отростков и тел нейронов. Нервная система — это не только рефлекторные дуги, но и ретикулярные синцитиальные сплетения. Ретикулярная концепция расширяет и углубляет нейронную теорию. Они должны рассматриваться вместе, как единая теория нервной системы.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Дмитрию Анатольевичу Мехилийнену за помощь в подготовке статьи.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке “Программы фундаментальных научных исследований академий” на 2013–2020 годы (ГП -14, раздел 64).

#### 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

- Дойников Б.С. Избранные труды по нейроморфологии и нейропатологии. М.: Медгиз, 1955. 467 с.
- Заварзин А.А. Очерки по эволюционной гистологии нервной системы. М.-Л.: Медгиз, 1941. 379 с.
- Келликер А. Гистология или учебник о тканях человека. СПб: Типография А. Голицина, 1865. 759 с.
- Лавдовский М.Д., Овсянников Ф.В. Основания к изучению микроскопической анатомии человека и животных. Т. 1. СПб: Изд-во К. Риккера, 1887. 247 с.
- Сергеева С.С., Сотников О.С., Парамонова Н.М. Способ создания нейрофизиологической модели простой нервной системы, обладающей реверберацией // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. Т. 106. № 8. С. 1–7.
- Сотников О.С. Объединенная нейронно-ретикулярная теория. СПб.: Наука, 2019. 239 с.
- Belousov A.B. The regulation and role of neuronal gap junctions during neuronal injury // Channels (Austin). 2012. V. 6. №5. P. 390–392.
- Belousov A.B., Fontes J.D. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury // Trends Neurosci. 2013. V. 36. № 4. P. 227–236.
- Blümcke I., Wiestler O.D. Gangliogliomas: an intriguing tumor entity associated with focal epilepsies // J. Neuro-pathol. Exp. Neurol. 2002. V. 61. № 7. P. 575–584. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.7.575>
- Furshpan E.J., Potter D.D. Transmission at the giant motor synapse of the crayfish // J. Physiol. (Lond.). 1959. V. 145. P. 289–325.
- Hirohata S. Histopathology of central nervous system lesions in Behçet’s disease // J. Neurol. Sci. 2008. V. 267. № 1–2. P. 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.041>
- Joyon N., Tauziède-Espariat A., Alentorn A. et al. K27M mutation in H3F3A in ganglioglioma grade I with spontaneous malignant transformation extends the histopathological spectrum of the histone H3 oncogenic pathway // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2017. V. 43. № 3. P. 271–276. <https://doi.org/10.1111/nan.12329>
- Kawataki T., Sato E., Sato T. et al. Anaplastic ganglioglioma with malignant features in both neuronal and glial components-case report // Neurol. Med. Chir. (Tokyo). 2010. V. 50. № 3. P. 228–231. <https://doi.org/10.2176/nmc.50.228>
- Nagy J.I., Pereda A.E., Rash J.E. On the occurrence and enigmatic functions of mixed (chemical plus electrical) synapses in the mammalian CNS // Neurosci. Lett. 2019. V. 695. P. 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.021>
- Peng Y., Wang X., Guo Y. et al. Pattern of cell-to-cell transfer of microRNA by gap junction and its effect on the proliferation of glioma cells // Cancer Sci. 2019. V. 110. № 6. P. 1947–1958. <https://doi.org/10.1111/cas.14029>
- Ramon y Cajal S. Neuron theory or reticular theory? Objective evidence of the anatomical unity of nerve cells. Madrid: Inst. Ramon y Cajal, 1954. 144 p.
- Sosa J.M., Sosa H.M.S. The multiplication of nerve cells by amitotic division during extrauterine life in mammals // Acta Anat. (Basel). 1972. V. 82. № 4. P. 579–605.
- Tonner F. Ein Beitrag zur Anatomie und Physiologie des Peripheren Nervensystem von Astacus Fluviatilis // Zool. Jb. (Abt. Anat.). 1933. B. 53. S. 101–152.
- van Gehuchten A. La structure des centres nerveux: la melle épinière et le cervelet // La Cellule. 1891. V. 7. P. 79–122.
- Wagner R. Neurologische Untersuchungen. Göttingen: G.H. Wigand, 1854. 244 S.
- Zhu S.Q., Qi L., Rui Y.F. et al. Astragaloside IV inhibits spontaneous synaptic transmission and synchronized Ca<sup>2+</sup> oscillations on hippocampal neurons // Acta Pharmacol. Sin. 2008. V. 29. № 1. P. 57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00712.x>



## Distant Syncytia of Adjacent Neuronal Anastomoses

O. S. Sotnikov<sup>a, \*</sup> and L. A. Davydova<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*

*\*e-mail: ossotnikov@mail.ru*

It is known that an anastomosis (Greek) is “an opening connecting tubular structures”. However, the previously described interneuronal fiber non-synaptic connections were usually considered as commissural, and their appearance was hypothetically associated with not the usual, but often repeated division of neuronal nuclei and the growth of neurites connecting them. The aim of our work was to revise this fixed-drug hypothesis from the perspective of the kinetics of living neurons. It was shown that paired connections of neurons are formed not by cell division, but by the fusion of their two nerve processes and bodies. It is shown that the axoplasmic current (gel), reducing the interneuronal commissures, brings the cells together until they merge. It became clear that the fragments of connecting fibers are not just commissural processes, but represent a tubular electrically and tinctorially permeable, retracting system — an anastomosis. Like any anastomosis, this structure has two terminal perforations, that is, it is a distant syncytium. This syncytium is described for the first time and probably only in process nerve structures. Therefore, we analyzed monograph classic neurohistology and Ramon y Cajal. In the works of the author, there were found ubiquitous multiple, previously unidentified, distant anastomoses, which, in our opinion, should significantly affect the electrical properties of the nervous system.

**Keywords:** neuronal anastomoses, commissural connection of neurons, fusion of nerve processes, axoplasmic current, binuclear cells

УДК 598.842.3

## ЦИФРОВОЙ МЕХАНИЗМ ПРИЕМА-ПЕРЕДАЧИ АКУСТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У ПТИЦ

© 2021 г. Б. М. Звонов\*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия*

*\*e-mail: Zvonovbm@gmail.com*

Поступила в редакцию 08.01.2021 г.

После доработки 22.01.2021 г.

Принята к публикации 22.01.2021 г.

Изучены пути приема и передачи акустического сигнала у птиц. Для этого проанализированы механизмы акустической изоляции у птиц, изучено построение сигналов бедствия и тревоги у различных видов птиц, рассмотрена изменчивость сигнала для обеспечения индивидуальности в границах видового сигнала. Выяснено, что все механизмы обеспечиваются временной дискретностью сигнала, который эволюционно исходит из одночастотного сигнала, что показано с помощью методики денервации сиринкса. Изучение нервной активности первичных слуховых ядер птиц показало, что слуховая система птиц адаптирована к анализу строгой временной дискретности акустических сигналов. Для подтверждения функциональности временной дискретности акустических сигналов в жизни птиц создана компьютерная программа цифрового электронно-акустического синтезатора репеллентных сигналов для управления поведением птиц, основанная на принципах построения естественных сигналов бедствия птиц. В результате стало возможным создание универсального сигнала для всех видов птиц, а также комбинаций сигналов и их случайных воспроизведений во времени, чтобы птицы не привыкали к синтезированному сигналу репеллента.

**Ключевые слова:** цифровой механизм, акустическая изоляция, нейронная активность, денервация сиринкса, синтезатор репеллентных сигналов

**DOI:** 10.31857/S0042132421040086

### ВВЕДЕНИЕ

Использование акустической информации в жизни птиц так же необходимо как питание и размножение. Именно акустическая сигнализация обеспечивает птицам изоляцию при образовании пары, выкармливании птенцов и их воспитании, обеспечивая защиту своей территории от видовых соперников (Звонов, 2020). Акустическая сигнализация обеспечивает безопасность, когда птицы издают тревожные сигналы и сигналы бедствия не только для своего вида, но и для других видов.

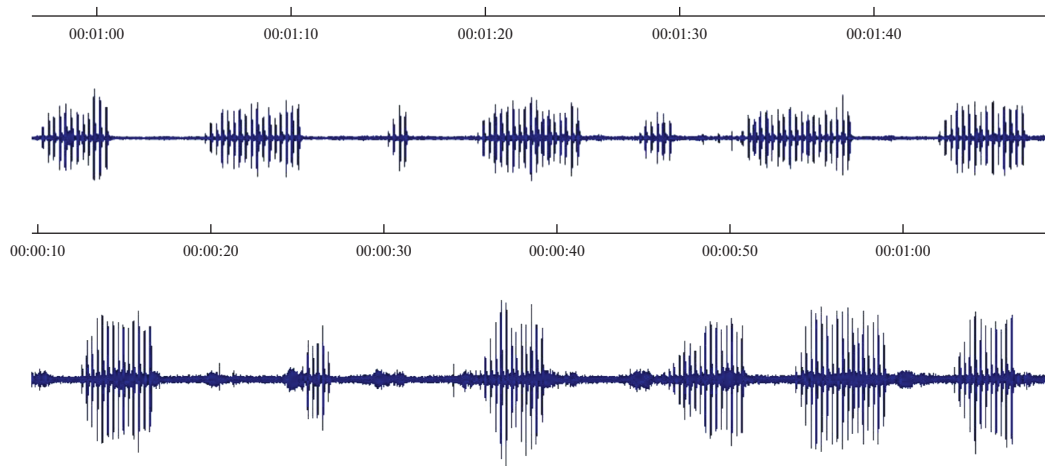
Чтобы выяснить, какие способы передачи акустической информации используют птицы в своей жизнедеятельности, обратимся к созданию акустического изолирующего механизма во внутривидовом общении. Рекламирующая видовая песня птиц является маркером для фиксации территориального участка многих видов птиц. Ее значение настолько велико, что во весь период от откладки яиц парой до полного выращивания птенцов песня самца маркирует их территориальный участок и оберегает птиц своего вида от нежелательного проникновения соседей. Такое определяющее действие акустического сигнала застав-

ляет исследовать механизм образования элементов сигнала, которые отличают песню данного самца от соседей, оставаясь при этом в пределах видового сигнала.

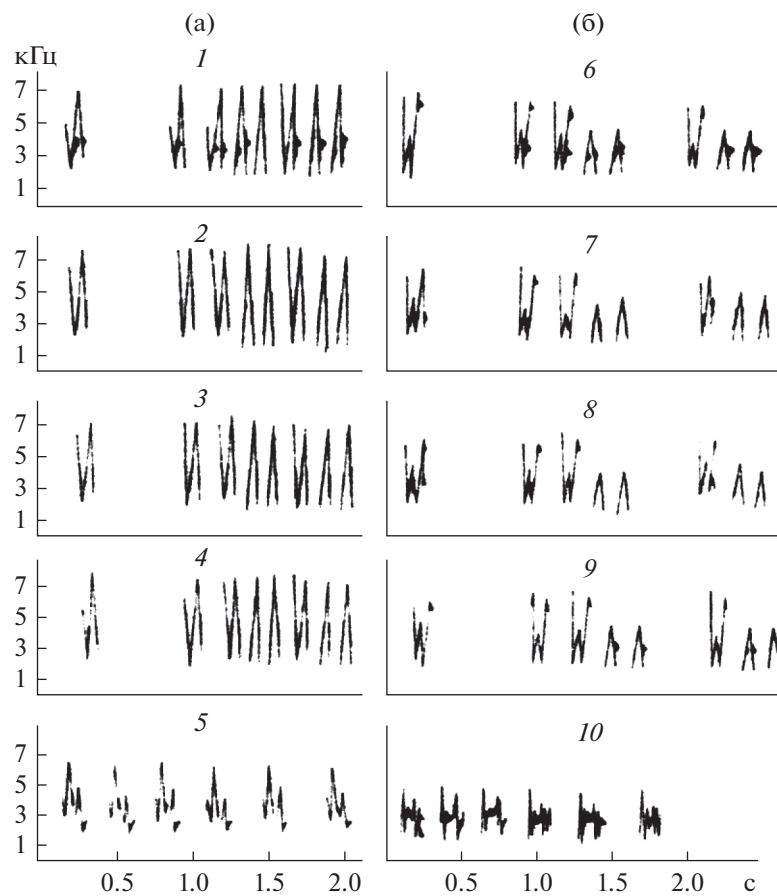
### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На рис. 1 приведены осциллограммы рекламирующих песен двух самцов-соседей пеночек-теньковок. Несложный подсчет длительности отдельного периода в сериях первой и второй особи показывает достоверную разницу у обоих самцов в течение всего репродуктивного периода, и она оказалась константой для каждой особи  $T_1 = 0.27$  с,  $T_2 = 0.32$  с. Разница в длительностях составляет всего 0.05 с, то есть 50 мс. И это является определяющим маркером отдельного самца при территориальной близости к другому самцу. В дальнейшем мы должны будем убедиться, способна или нет слуховая система птиц анализировать столь малые различия в длительности интервалов между импульсами.

Далее обратимся к анализу временных различий в рекламирующих песнях других видов. Анализ песен двух особей соловьиной широкохвост-



**Рис. 1.** Рекламирующие песни двух самцов пеночек-теньковок *Phylloscopus collybitus*. Верхняя последовательность — самец № 1, нижняя — самец № 2.



**Рис. 2.** Видовые песни двух особей (а) и (б) соловьиной широкохвостки *Cettia cetti*, записанные с интервалом в 4 дня; 5, 10 — их тревожные сигналы.

ки *Cettia cetti* (рис. 2), записанных с интервалом в четыре дня в течение 20 дней, показал полное совпадение как в частотных параметрах, так и во временных на протяжении всего срока наблюде-

ния. Это говорит о стабильности физических параметров песни особи. Здесь же следует отметить, что в тревожных сигналах этих особей (рис. 2, 5, 10) временной рисунок меняется в сторону учащения

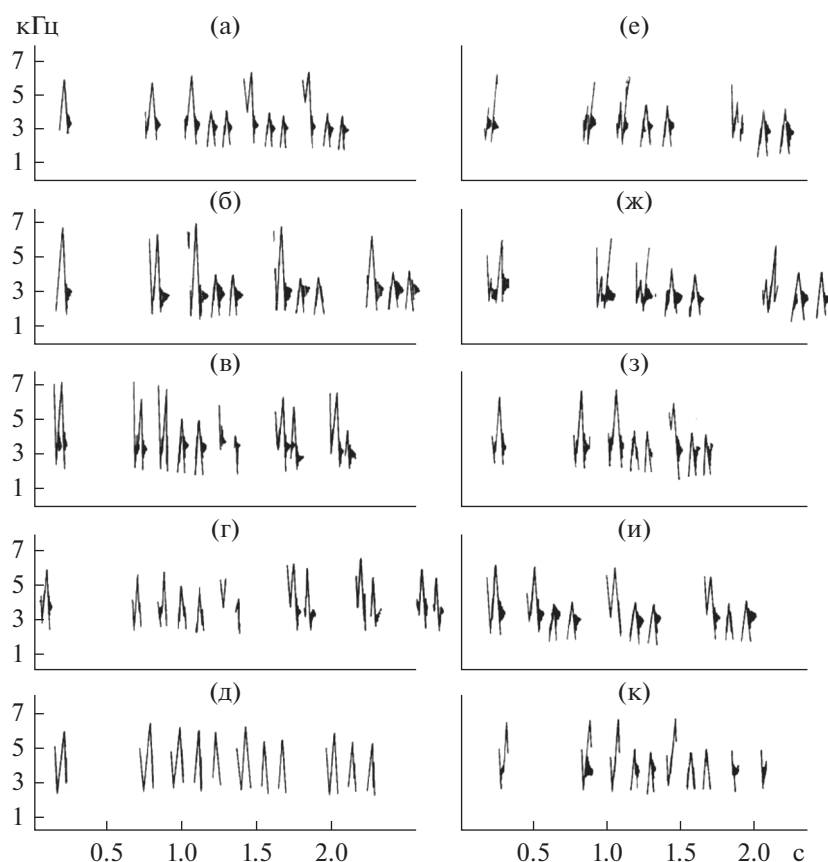


Рис. 3. Видовые песни 10 особей соловьиной широкохвостки *Cettia cetti*.

и подобия, что говорит об универсальности этого сигнала как для видового, так и для межвидового общения птиц.

На рис. 3 приведены рекламирующие песни 10 особей широкохвостки, чтобы показать, как отдельные особи изменяют рисунок своей песни во временных параметрах, оставаясь узнаваемыми как вид.

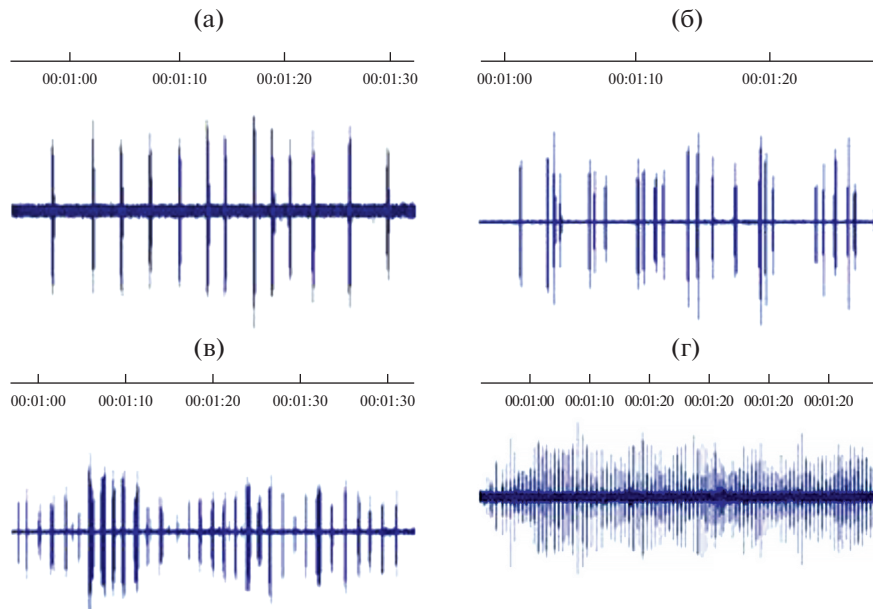
Теперь обратимся к организации тревожных сигналов у различных видов птиц.

На рис. 4 приведены осциллограммы тревожных сигналов и сигналов бедствия птенцов из различных семейств. Привлекает внимание тот факт, что все сигналы построены по одному принципу — короткие, часто повторяющиеся импульсы, которые легко преобразовать в цифровой механизм. Именно такое построение сигнала является естественным для птенца и в то же время наиболее дальноточным для привлечения родителей.

Необходимо выяснить, какую структуру имел первоначально акустический сигнал птиц, который затем преобразовался в ритмический, чтобы обеспечивать надежную дистанционную связь как на внутривидовом, так и межвидовом уровне.

Рассмотрим акустическую коммуникацию речной крачки *Sterna hirundo* (рис. 5).

В левой колонке (а, б, в, г, д) приведены сонограммы призывных сигналов пяти особей речной крачки. Все сигналы построены на ритмической основе и индивидуальны. Были записаны коммуникативные сигналы одной самки и ее самца в различных ситуациях: е — сигнал самки при посадке к гнезду, ж — сигнал самца на противника, з — сигнал самки на самца с кормом, и — сигнал самки перед спариванием, к — сигнал самки после спаривания, л — призывный сигнал самки. Все многообразие сигналов построено на использовании различных временных построений, поддающихся цифровой интерпретации. Затем проводились исследования с использованием методики денервации сирикса с целью выяснения влияния нервной регуляции на структуру сигнала. При двусторонней денервации (рис. 5о), когда нервная регуляция отсутствует, сигнал теряет свою временную дискретность и предстает таким, каким он был первоначально. Именно на его основе в процессе эволюции строились сложные коммуникативные акустические сигналы (Звонов, 2011). Следует отметить, что, когда самка,



**Рис. 4.** Осциллограммы сигналов тревоги и бедствия птенцов некоторых видов птиц. (а) — сигнал тревоги 10-дневного птенца полярной крачки *Sterna paradisaea*; (б) — слеток большого баклана *Phalacrocorax carbo*; (в) — 2-недельный птенец рыжей цапли *Ardea purpurea*; (г) — недельный птенец тундряной куропатки *Lagopus mutus*.

ся на гнезде, издавала призывный сигнал после денервации, самец ее не узнавал и игнорировал.

Теперь обратимся к возможностям слуховой системы птиц воспринимать и обрабатывать акустическую информацию. Мы проанализировали обработку акустической информации первичными слуховыми ядрами птиц — ангулярным (n. angularis), магноцеллюлярным (n. magnocellularis) и ламинарным (n. laminaris). Для этого применялась методика отведения нейронной активности отдельных нейронов первичных слуховых ядер. После отведения производился морфоконтроль для определения локализации кончика микроэлектродов в том или ином ядре.

Прямым доказательством кодирования длительности отдельных элементов и слогов является наличие в первичных слуховых ядрах двух типов нейронов: тонических и фазических, способных с большой степенью точности кодировать информацию о длительности сигналов. Были найдены как фазические, так и тонические нейроны. На рис. 6 приведены фазический нейрон № 31 и тонический — № 35.

Точно так же тонические нейроны №№ 34 и 67 следят за изменением длительности стимула (рис. 7).

Не менее важно отметить “способность” нейронов первичных слуховых ядер птиц иметь быстрые циклы восстановления, чтобы следить за изменением длительности пауз между импульсами (рис. 8).

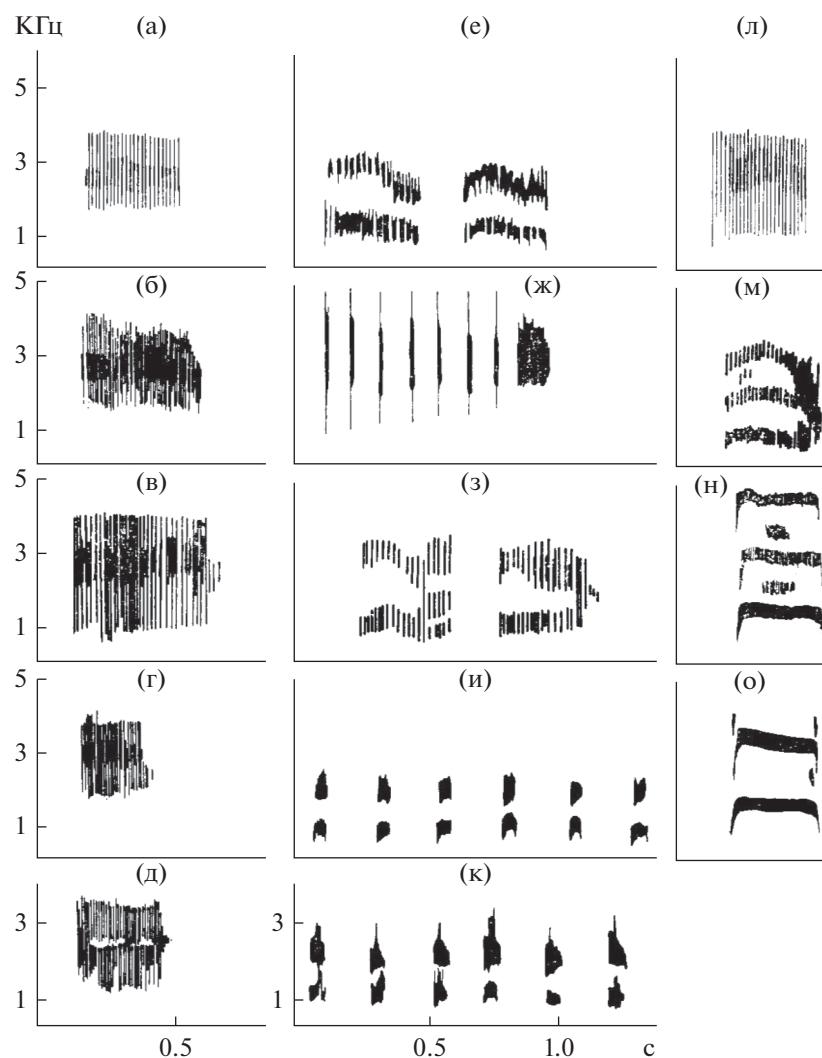
Это очень важно в тех случаях, когда индивидуальные различия определяются длительностью пауз между отдельными элементами и слогами песни.

До определенных частот (более 1000 Гц) отдельные нейроны разряжаются синхронно с частотой заполнения сигнала. Следовательно, при поступлении дискретного (ритмического) сигнала, состоящего из отдельных импульсов с частотой 1000 Гц и более, нижние уровни слухового анализатора “способны” анализировать частотное разрешение длительностью 1 мс (Konishi, 1969). Именно такие сверхмалые интервалы между импульсами в сериях, например теньковок, возникают при образовании индивидуальных особенностей песен. Заметим, что слуховая система человека по этому показателю на порядок хуже.

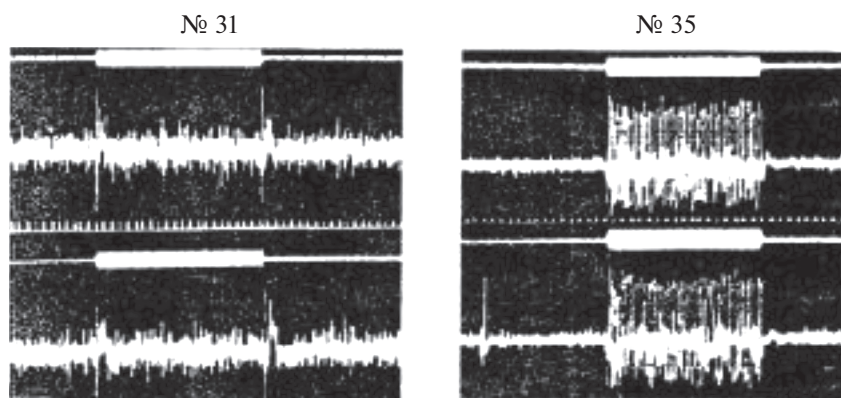
Для подтверждения прямого воздействия импульсных сигналов с нужной временной структурой, был создан цифровой электронно-акустический синтезатор репеллентных сигналов птиц, на который был выдан патент (Звонов, Терсков, 2000).

За основу были взяты импульсные сигналы, из которых построены сигналы бедствия птиц (рис. 4). Именно импульсные сигналы с их крутыми фронтами, обеспечивают наиболее широкий частотный диапазон, так необходимый для обеспечения использования синтезатора для любых видов птиц.

Импульсная последовательность формируется следующим образом (рис. 9). Отдельная акустическая серия состоит из ряда импульсов, длительность которых изменяется от сеанса к сеансу в пределах наиболее эффективного репеллентного воздействия. По такому же принципу изменяется и интервал между импульсами. Количество импульсов в серии также изменяется для достижения



**Рис. 5.** Сигнализация речной крачки в норме и после денервации сирикса: а–д — индивидуальные различия призывного сигнала самок, е — сигнал самки при посадке к гнезду, ж — сигнал самца на противника, з — сигнал самки на самца с кормом, и — сигнал самки перед спариванием, к — сигнал самки после спаривания, л — призывный сигнал самки, м — призывный сигнал самки при денервации сирикса справа, н — призывный сигнал самки при денервации сирикса слева, о — призывный сигнал самки при двусторонней денервации сирикса (по: Звонов, 1986).



**Рис. 6.** Реакция фазического (№ 31) и тонического (№ 35) нейронов на акустический стимул.



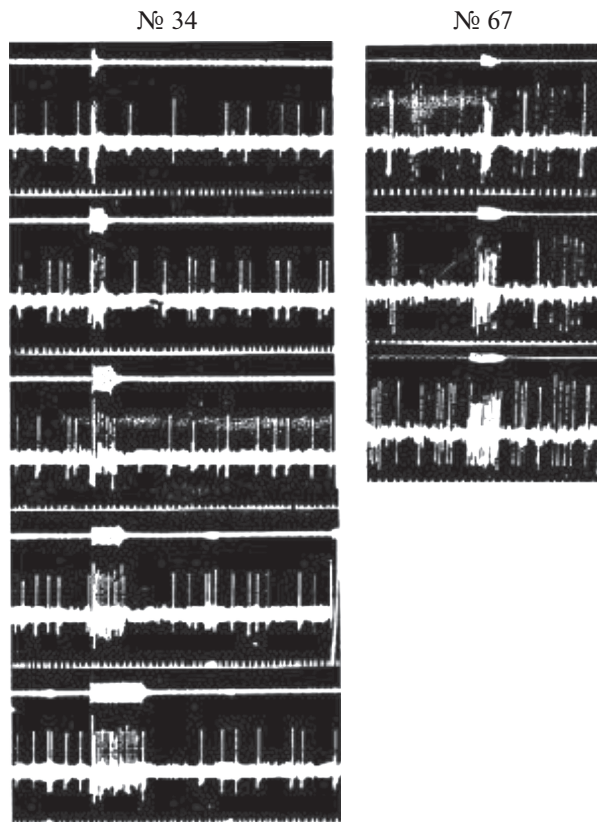


Рис. 7. Реакция нейронов №№ 34 и 67 с тоническим типом разряда на изменение длительности стимула.

максимального отпугивающего эффекта. Следующей, третьей переменной, является длительность серии. И, наконец, четвертая переменная — периодичность воспроизведения серий. Комбинация этих переменных в пределах наибольшего репеллентного эффекта обеспечивает устойчивое непривыкание к акустическому сигналу. За счет разработанной нами компьютерной программы (Электронно-акустический синтезатор репеллентных сигналов птиц) достигается создание нескольких сотен комбинаций, которые выбираются по случайному закону.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Только в совокупности изучения акустической сигнализации птиц и возможностей ее слуховой системы анализировать тонкости изменчивости сигнала в зависимости от жизненной необходимости можно понять акустическую коммуникацию птиц.

О значении временных параметров в передаче акустической информации имеются данные (Звонов, 1989, 2004, 2005, 2008; Jouventin, 1972; Bergmann, 1973; Lemon, 1974; Sossinka, Bohner, 1980) для многих видов птиц. Большинство из этих видов имеют несложную, компактную пес-

ню с ярко выраженными видовыми признаками. Наиболее сложен вопрос с видами, у которых невозможно выделить сколько-нибудь определенной территориальной видовой песни, и тем более с видами пересмешниками и имитаторами, включающими в свой репертуар заимствованные от других видов элементы. Так, у черной каменки не обнаружены песни, общие для всех особей даже одной локальной популяции (Костина, Панов, 1981). В большинстве случаев варианты, общие для двух или нескольких особей, являются имитациями сигналов других видов птиц и весьма просты по своей структуре. Однако авторам удалось установить, что выявленные различия между песнями рассмотренных трех форм данного вида опистолика (*opistholeuca*), капистрата (*capistrata*) и пиката (*picata*) затрагивают не структуру индивидуальных песен, а тип организации песенной последовательности. Такая организация видовой сигнала, безусловно, является более сложной формой ритмической организации, и не исключено, что это одна из стадий эволюционного процесса, затрагивающего становление строгой структурной организации видовой сигнала. Очевидно, при такой организации сигнала имеется большой простор для создания индивидуальных различий в ритмической организации. Найденная определенная песенная последовательность позволяет говорить и об определенной форме цифрового кода.

Имеющиеся работы по географической изменчивости песен птиц (Синежук, Кречмар, 2010; Podos, Warren, 2007) показывают, что подобная изменчивость носит дискретный характер и проявляется в форме диалектов.

А как же поступает в таком случае соловей, чья песня построена из сложных перепевов и слогов? Е.Н. Панов отмечает (1983), что песня соловья обладает явной и четкой ритмической структурой, которая держится на принципе комбинирования множества контрастирующих друг с другом звуков в разнообразные, но все же частично предсказуемые конструкции. Слагающие эту песню сигналы сами по себе не несут никакого смыслового значения. Для тех потребностей общения, которые обслуживает песня птиц, вполне достаточно, чтобы все самцы данного вида пользовались общей ритмической и частотной схемой пения, в то время как исходные элементы, воплощающие эту схему, могут быть достаточно различны у разных особей. Таким образом, даже в столь сложном сигнале, как песня соловья, можно выделить вполне определенную закономерность, основанную на ритмической структуре, которая и несет видовую и индивидуальную информацию. И как каждая ритмическая структура укладывается в определенный цифровой код.

Другой вопрос, зачем соловью так сложно строить свою песню, когда, казалось бы, все это



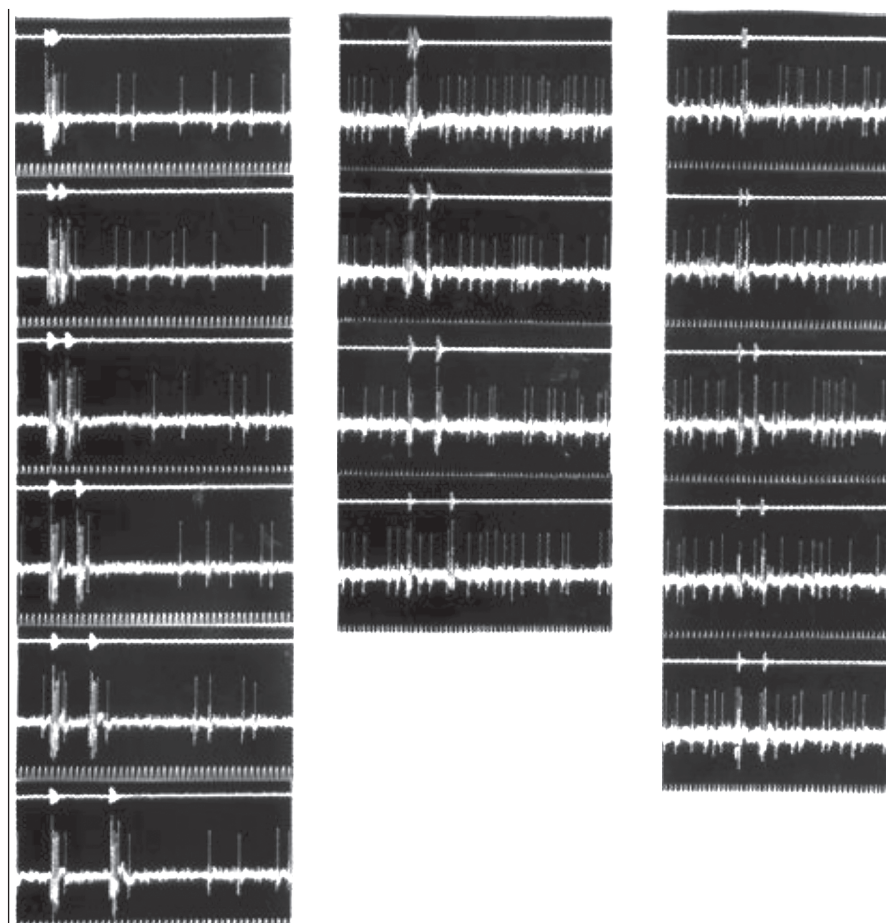


Рис. 8. Реакция отдельных нейронов на изменение паузы между импульсами (по: Звонov, 2005).

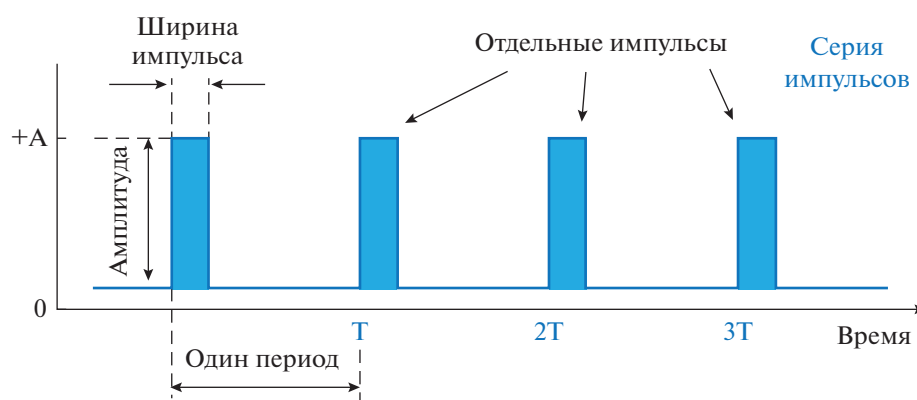


Рис. 9. Импульсная последовательность репеллентного сигнала.

можно сделать проще, как, например, в сигнализации коростеля (Грабовский, 1985), который достаточно просто строит свою акустическую коммуникацию, ограничиваясь односложными сигналами, но варьируя при этом длительностью секвенций. Соловей же обладает развитой нижней гортанью — сири́нском, который дает воз-

можность создавать сложные частотно-модулированные звуки. Однако, так же как у коростеля, все они затем строятся в секвенции, представляющие собой один из вариантов ритмической организации. И такое положение оказывается вполне оправданным, так как имеющиеся на сегодняшний день работы (Tretzel, 1970; Guttinger, 1972; Winder-

le, 1979; Brenowitz, 1982) показывают, что при на- следовании песни наиболее четко закреплена ге- нетически именно их ритмическая структура.

Так как аналогичная картина проявляется у насекомых (Жантиев, Дубровин, 1974; Alexander, 1960), амфибий (Thompson, Martof, 1957; Littlejohn, Main, 1959; Littlejohn, Michaud, 1959; Blair, 1964), млекопитающих (Воронцов и др., 1969; Miller, 1944), хотелось бы считать это правило од- ним из основных правил биоакустической дивер- генции у животных вообще, независимо от их си- стематической принадлежности.

Анализ полученных данных свидетельствует о большом разнообразии акустических сигналов, используемых птицами для целей дивергенции (смещение частотного диапазона, изменение вре- менных характеристик отдельных элементов и слогов песни, использование амплитудной и ча- стотной модуляции, изменение количественного соотношения слогов). Необходимо лишь заметить, что при всем разнообразии средств для создания акустического изолирующего механизма основны- ми являются различия во временных параметрах построения песни или отдельных ее компонентов.

Определив, какую роль в кодировании акусти- ческой информации у птиц играют временные параметры сигнала, важно выяснить возмож- ность обработки этих параметров на различных уровнях акустического анализатора у птиц.

Исследование периферического отдела слухо- вого анализатора показывает (Konishi, 1970; Moller, 1972), что уже на уровне улитки осуществ- ляется частотный анализ. Причем границы спек- тра частот, воспринимаемых улиткой, превосхо- дят границы спектра частот, который данный вид использует в видовом общении. Такая возмож- ность периферического отдела вполне оправдана, так как с одной стороны, вид должен восприни- мать звуки своих соседей, которые могут нести ин- формацию о возможной опасности, а с другой — слуховая система должна идти несколько впереди звукоиздающей системы в своем развитии, чтобы обеспечить возможность восприятия изменяю- щихся в эволюционном процессе звуковых сиг- налов своего вида.

Таким образом, мы видим, что функциональ- ные характеристики слуховой системы как на уровне периферических, так и на уровне цен- тральных ее отделов обнаруживают хорошее со- ответствие параметрам брачных сигналов, имею- щим опознавательное значение.

Певчие птицы обучаются анализировать и из- давать сигналы, использующиеся во внутривидо- вой коммуникации, а процессы обучения связа- ны с целостностью слуховых путей головного мозга. Пластичность обучения птиц отражается в аналитических процессах слуховых нейронов. И обучение слуховой системы направлено на стро-

гую фиксацию как длительности отдельных по- сылок, так и интервалов между ними.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что акустический сигнал, издавае- мый птицей для передачи информации, имеет аналогового форму. При этом его структура из- менчива в зависимости от жизненной ситуации (тревога, охрана территории, связь с птенцом, коммуникация с партнером и т. д.). И эта измен- чивость структуры определяется подвижностью временных параметров отдельных слогов сигнала и интервалов между ними за счет влияния нерв- ной регуляции, что создает неограниченные воз- можности информационного многообразия. В то же время частотный диапазон сигнала определя- ется возможностями морфологических структур звукоиздающего аппарата птиц — у мелких воро- бьиных он располагается в более высокочастот- ном спектре, а крупных птиц — в низкочастотном. Такой аналоговый сигнал уже на первичном уровне обработки нейронными сетями слуховых ядер преобразуется в цифровую форму, т.к. раз- ряды нейронов имеют импульсную структуру, и дальнейший ход обработки информации строит- ся по цифровой форме в виде “0–1”.

Электронно-акустический синтезатор позво- ляет генерировать сигналы с крутыми фронтами, что обеспечивает (по закону Фурье) перекрытие всего спектра частот, к которым адаптирована слуховая система птиц — от 100 до 20000 гц. Варьирование временными параметрами акусти- ческого сигнала создает множественность комби- наций и их случайное воспроизведение во времени, чтобы птицы не привыкали к синтезированному сигналу репеллента.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо иссле- дований с участием людей и животных в качестве объ- ектов изучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронцов Н.П., Ляпунова Е.А., Загоруйко Н.Г. Сравни- тельная кариология и становление изолирующих механизмов в роде *Marmota* // Зоол. журн. 1969. Т. 48. Вып. 3. С. 67–74.
- Грабовский И.И. Акустическая сигнализация и комму- никация в локальном поселении коростелей // Зоол. журн. 1985. Т. 62. Вып. 2. С. 314–319.
- Жантиев Р.Д., Дубровин Н.Н. Звуковые сигналы сверч- ков (Orthoptera, Oecanthidae, Gryllidae) // Зоол. журн. 1974. Т. 53. Вып. 3. С. 91–98.

- Звонов Б.М. Цифровой код в передаче акустической информации у птиц // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1989. № 50. С. 50–57.
- Звонов Б.М. Акустический образ чечевицы обыкновенной (*Carpodacus erythrinus* (Pall.)) // Изв. РАН. Сер. биол. 2004. № 5. С. 561–565.
- Звонов Б.М. Механизм передачи акустической информации у птиц // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. № 2. С. 189–200.
- Звонов Б.М. Акустический образ ремеза (*Remiz pendulinus* (L.)) // Вестн. международной общественной академии экологической безопасности и природопользования (МОАЭБП). 2008. Вып. № 3 (10). С. 74–82.
- Звонов Б.М. Пути развития акустических сигналов у птиц // Успехи соврем. биол. 2011. Т. 131. № 3. 326–334.
- Звонов Б.М. Механизм акустической изоляции у птиц на примере теньковки *Phylloscopus collybitus* // Рус. орнитол. журн. 2020. Т. 29. Экспресс-вып. 1996. С. 5263–5271.
- Звонов Б.М., Терсков Н.Г. Способ синтеза репеллентных сигналов животных и устройство для его осуществления. 2000. Патент № 2147178 от 10.04.2000 г.
- Костина Г.Н., Панов Е.Н. Индивидуальная и географическая изменчивость песни у черной камчатки *Oenanthe picata* // Зоол. журн. 1981. Т. 60. Вып. 9. С. 164–172.
- Панов Е.Н. Знаки, символы, языки. 2-е изд., доп. М.: Знание, 1983. 240 с.
- Синежук Е.Б., Кречмар Е.А. Географическая изменчивость демонстративной песни обыкновенной чечевицы (*Carpodacus erythrinus*) // Зоол. журн. 2010. Т. 89. № 3. С. 1–14.
- Alexander R.D. Sound communication in Orthoptera and Cicadidae // Animal sound and communication / Eds W.E. Lanyon, W.N. Tavolga. AIBS Bull. 1960. V. 7. P. 217–229.
- Bergmann H.-H. Die Imitationsleistung einer Mischsänger-Dorngras-Mücke (*Sylvia communis*) Ein Beitrag zum Problem Angeborener und Erworbener Gesangsmerkmale // J. Ornithol. 1973. V. 114. № 3. P. 317–332.
- Blair W.F. Isolating mechanisms and interspecies interaction in Anuran amphibian // Quart. Rev. Biol. 1964. V. 39. P. 164–177.
- Brenowitz E.A. The active space of red winged blackbird song // J. Comp. Physiol. 1982. V. 147. № 4. P. 511–529.
- Guttinger H.R. Elementwahl und Strophenaufbau in der Gesangsentwicklung einiger Papageiamadinen-Arten (Gattung: Erythrura, Familie: Estrididae) // Z. Tierpsychol. 1972. V. 31. № 1. P. 68–86.
- Jouventin P. Un nouveau systeme de reconnaissance acoustique chez les oiseaux // Behaviour. 1972. V. 43. № 1–4. P. 176–191.
- Konishi M. Time resolution by single auditory neurons in birds // Nature. 1969. V. 222. № 5. P. 193–202.
- Konishi M. Hearing, single-unit analysis and vocalization in songbirds // Science. 1970. V. 166. P. 46–73.
- Littlejohn M., Main A. Call structure in two genera of Australian burrowing // Copeia. 1959. № 3. P. 86–91.
- Littlejohn M., Michaud T. Mating call discrimination by females of Stretcher's chorus frog *Pseudacris streckeri* // Texas J. Sci. 1959. V. 11. P. 301–320.
- Lemon R.E. Song dialects song matching and species recognition by cardinals *Richmondia cardinalis* // Ibis. 1974. V. 116. № 4. P. 545–557.
- Miller A.H. Specific differences in the notes chipmunks // J. Mammal. 1944. V. 25. P. 32–45.
- Moller A.R. Coding of sounds in lower levels of the auditory system // Quart. Rev. Biophys. 1972. V. 5. № 1. P. 59–71.
- Podos J., Warren P. The evolution of geographic variation in birdsong // Adv. Stud. Behav. 2007. V. 37. P. 403–458.
- Sossinka R., Bohner J. Song types in the zebra finch *Poephila guttata castanotis* // Z. Tierpsychol. 1980. V. 53. № 2. P. 123–132.
- Tretzel S. Akustisches. Lerner und Rhythmusangleichung bei Schamadrosseln (*Copsychus malabaricus* Scop.) // Zool. Anz.-Supplement. 1970. V. 33. P. 290–302.
- Thompson E., Martof B. A comparison of the physical characteristics of frog calls (*Pseudacris*) // Physiol. Zool. 1957. V. 30. P. 67–81.
- Winderle J.M. Components of song used for species recognition in the common yellowthroat // Anim. Behav. 1979. V. 27. № 4. P. 982–989.

## Digital Mechanism for Receiving and Transmitting Acoustic Information in Birds

B. M. Zvonov\*

Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

\*e-mail: Zvonovbm@gmail.com

The ways of receiving and transmitting an acoustic signal in birds have been studied. For this, the mechanisms of acoustic isolation in birds have been analyzed, the construction of distress and alarm signals in various bird species has been studied, and the variability of the signal to ensure individuality within the boundaries of the species signal has been considered. It was found that all mechanisms are provided by the temporal discreteness of the signal, which evolutionarily comes from a single-frequency signal, which is shown using the syrinx denervation technique. The study of the nervous activity of the primary auditory nuclei of birds showed that the auditory system of birds is adapted to the analysis of strict temporal discreteness of acoustic signals. To confirm the functionality of the temporal discreteness of acoustic signals in the life of birds, a computer program has been created for a digital electronic-acoustic synthesizer of repellent signals for controlling the behavior of birds, based on the principles of constructing natural distress signals for birds. As a result, it became possible to create a universal signal for all species of birds, as well as a multiplicity of signal combinations and their random reproduction in time, so that birds do not get used to the synthesized signal of the repellent.

**Keywords:** digital mechanism, acoustic isolation, neural activity, syrinx denervation, synthesizer of repellent signals

УДК 591.478

## К ИЗУЧЕНИЮ ЛИНЬКИ ВОЛОСЯНОГО ПОКРОВА МЕЛКИХ ЛЕСНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ОПЫТ АНАЛИТИЧЕСКОГО ОБЗОРА СОСТОЯНИЯ ПРОБЛЕМЫ)

© 2021 г. Э. В. Ивантер<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup>Карельский научный центр РАН, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: Ivanter@petrsu.ru

Поступила в редакцию 17.02.2021 г.

После доработки 26.02.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

Для мелких насекомоядных и грызунов, существующих в условиях постоянных термических дефицитов и проводящих много времени в лесной подстилке и ходах нор, постоянно соприкасаясь с твердым субстратом, регулярная смена волосяного покрова имеет особое значение. Согласно проведенным исследованиям, сроки и интенсивность линьки изменяются в зависимости от экологических условий и физиологического состояния зверьков. В этой связи конкретные особенности хода и темпов смены волос у особей различных половых и возрастных групп могут служить своеобразным индикатором состояния всей популяции и сигнализировать о серьезных нарушениях важных эколого-физиологических и популяционных процессов. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии существенных видовых различий в сроках, интенсивности и ходе сезонных линек, тогда как связь с полом, возрастом и состоянием популяции выступает достаточно отчетливо. На основе изучения массовых видов землероек и грызунов Карелии у них выявлены исключительная устойчивость и однообразие в последовательности смены волос, которые почти не зависят от образа жизни зверьков. У большинства видов она происходит по сублатеральному (дорсальному) типу, при котором новые волосы появляются сначала на нижних частях боков и головы, затем на брюшке и спине, и в последнюю очередь вылинивают верх головы и задняя часть спины.

**Ключевые слова:** ход, интенсивность и топография сезонной смены шерстного покрова, теплозащитные свойства покровов

**DOI:** 10.31857/S0042132421040037

### ВВЕДЕНИЕ

Линька, то есть сезонная смена шерстного покрова и тесно связанные с ней изменения в коже млекопитающих, представляют собой очень тонкий биологический процесс, призванный обеспечить целостность покровов тела как основного защитного и теплоизоляционного образования. Для мелких насекомоядных и грызунов, проводящих много времени в лесной подстилке и ходах нор и постоянно соприкасающихся с твердым субстратом, регулярное перелинивание имеет особое значение, так как их волосяной покров быстро изнашивается и требует своевременной замены. Необходимость периодической смены меха диктуется также сезонными изменениями климата, являясь средством увеличения теплоотдачи летом и уменьшения — зимой. Как показали наши исследования, сроки и интенсивность линьки изменяются в зависимости от пола и возраста, а также от физиологического состояния

зверьков, кормовых и погодных условий. Поэтому конкретные особенности хода и темпов линьки у животных различных возрастных и половых групп могут служить своеобразным индикатором состояния всей популяции и сигнализировать о серьезных нарушениях важных эколого-физиологических и популяционных процессов.

Как показывают исследования (Кузнецов, 1952; Соколов, 1973; Чернова, Целикова, 2004; Ивантер, 2018, 2021; Nuväritinen et al., 1969 и др.), развитие нового волоса начинается с закладки остевых волос, от сумок которых отпочковываются уже зачатки пуховых. Процесс замещения волос у различных групп млекопитающих протекает неодинаково. В отличие от хищных зверей, зачаток нового волоса которых закладывается из клеточек дна луковицы старого, и по мере роста новый волос выталкивает отделившихся от луковицы, но довольно долго удерживающихся в волосяной сумке старой, у грызунов и насекомоядных за-

кладка зачатков новых волос происходит совершенно независимо от волосных сумок старых, выпадающих. Так что в противоположность хищникам группировка волос новой шерсти не соответствует у них таковой старой.

Своеобразно протекает у них и линька волосного покрова. В зачатках новых волос концентрируются зерна пигмента. Просвечивая через подкожную клетчатку, они придают синеватый цвет мездры (на внутренней поверхности кожи). И поскольку в разных участках шкурки линька обычно протекает не одновременно, а в определенной последовательности, на мездры образуется характерный рисунок — узор линьки, состоящий из так называемых линных пятен. По их расположению и форме удается судить о наступлении той или иной стадии линьки. С ростом волос, выносящих пигмент из кожи, происходит посветление мездры, идущее обычно в той же последовательности, в какой шло ее потемнение. Полностью очистившаяся от пятен мездра знаменует окончание процесса линьки.

С линькой нередко бывает связано изменение структуры шерсти и ее окраски, выраженное порой очень резко. Подлежат изменению и другие структуры. Так, дерма в ходе линьки разрыхляется развивающимися зачатками новых волос и соответственно этому утолщается, а в периоды между линьками уплотняется. Жировая прослойка, неплохо развитая зимой, к лету истончается или полностью исчезает. В период линьки также увеличивается потребность в минеральном питании и витаминах, повышается белковый обмен, усиливается возбудимость. Таким образом, в связанном с линькой физиологическом процессе участвует весь организм животного, но особенно эффективно гормональное воздействие гипофиза и щитовидной железы.

Между тем изучение линьки и других приспособительных особенностей волосного покрова мелких грызунов и насекомоядных представляет большой научный интерес, и прежде всего с позиций эволюционной морфологии, экологической физиологии и таксономии. Обитание этих животных в условиях постоянных термических дефицитов, а также свойственное им общее несовершенство химической терморегуляции выработали у них в процессе эволюции целый комплекс экологических и морфофизиологических приспособлений, направленных на сохранение оптимального энергетического баланса между организмом и средой при низких и крайне неустойчивых окружающих температурах. Отсюда возникла необходимость подробного исследования сезонно-возрастных изменений таких атрибутов физической терморегуляции массовых видов мелких млекопитающих, как строение и теплозащитные свойства шерсти, микроструктура волос, географиче-

ская и популяционная изменчивость этих показателей. Надо учитывать и общее слабое освещение этих вопросов в специальной литературе. В этих обстоятельствах представляется целесообразным представить заинтересованному читателю полученные нами данные по линьке волосного покрова массовых видов мелких млекопитающих таежного Севера, тем более, что по объему, диапазону и адекватности используемых методик они значительно превосходят практически все предшествующие публикации, причем как в нашей стране, так и за рубежом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для специальных исследований послужили 293 шкурки мелких зверьков, добытых в 1966–2014 гг. в различных районах Карелии, из них 68 — крота, 43 — обыкновенной, 44 — средней, 38 — малой землероек-бурозубок, 32 — водяной куторы, 26 — лесной мышовки, 50 — рыжей полевки, 36 — темной полевки и 24 — полевки-экономки.

Изучение линьки волосного покрова проводилось обычными, использовавшимися в аналогичных исследованиях методами (Кузнецов, 1932; Черевитинов и др., 1948; Депарма, 1951; Когтева, 1963; Соколов и др., 1986). При этом особенно широко применялся метод “картирования” — зарисовка на коллекционных карточках с трафаретами контура шкурки изменений окраски мездры и расположения линных пятен. Кроме того, в световом микроскопе определяли функциональное состояние наружных покровов, дифференцировали зрелые волосы от растущих, различали пигментированные и непигментированные участки закладки волоса у изученных образцов кожи и волос. Необходимость световой микроскопии была в данном случае вызвана тем, что только с ее помощью можно, например, безошибочно отличить растущий зимний волос от окончательно выросшего летнего той же длины. Для этого достаточно рассмотреть под бинокулярным микроскопом строение волосной луковицы: у зрелых волос оно закрытого (колбовидного) типа, а у растущих — открытого (сосочкового). Кроме того, закладка волос не везде сопровождается потемнением мездры. Поскольку волосы землероек имеют зонарную окраску и их концевые сегменты на разных участках шкурки неодинаковы по цвету (на спине темно-коричневые, на боках — бурые, а на брюхе — белые), то на боках и спине линные пятна бывают видны сразу, а на брюхе — лишь после того, как пробьются через кожу бывшие верхушки волос. Сегменты же стержня, лежащие ниже вершины, окрашены в черный цвет. Поэтому при микроскопии кожи с брюшка без видимых признаков линьки легко обнаруживаются характерные изменения (в частности, функционирующие воло-

сяные фолликулы), свидетельствующие о сезонной смене волос, даже при так называемой скрытой пигментации.

Кроме того, для установления сроков и стадий линьки крота на пунктах заготовки пушнины было просмотрено (в том числе с помощью бинокулярного микроскопа) более 150 его шкурок и привлечены данные о линьке различных видов мелких млекопитающих, содержащихся в 1800 коллекционных карточках лаборатории зоологии КарНЦ РАН.

Трудности в изучении линьки землероек связаны также с разновозрастным составом популяции. Продолжительность линьки одного зверька, как известно, невелика (Wogowski, 1958). Но у всей популяции этот процесс растянут, и в один и тот же период в ее составе встречаются особи, находящиеся на разных стадиях линьки. Отсюда неизбежные сложности в определении последовательности и топографии сезонной смены шерсти.

Определение теплоизоляционных свойств шкурок (по удельной теплопроводности) выполняли с помощью специального прибора ИТ-3, изготовленного по нашему заказу для измерения теплопроводности небольших по размеру неметаллических объектов в Киевском институте технической теплофизики АН УССР. Существенное преимущество этого прибора заключается в большой чувствительности и точности, а также в том, что все необходимые для расчета теплопроводности величины получают непосредственным измерением.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно многим авторам (Огнев, 1950; Павлова, 1951; Фадеев, 1955, и др.), у млекопитающих первыми обычно развиваются направляющие и остевые волосы. Что же касается очередности появления волос разных категорий, то у обыкновенной бурозубки проследить ее затруднительно. На разных стадиях линьки в коже одновременно находятся широкие фолликулы будущих направляющих и остевых волос и более узкие — пуховых. Позднее, когда становятся заметны уже хорошо сформированные концевые сегменты волос всех категорий и они пробиваются наружу, мездра начинает постепенно светлеть и утончается.

Как видно из приведенных в табл. 1 и рис. 1 данных, первая линька прибылых обыкновенных бурозубок, покинувших гнезда, происходит только осенью — в сентябре—октябре. Первые особи с темными пятнами на мездre, занимающими 20–90% площади шкурки (в среднем 46%), встречались, начиная с десятых чисел сентября (11.09.1959 г.; 12.09.1970 г., 13 и 16.09.2005 г.), во второй декаде этого месяца линяет уже более 60% исследованных зверьков, а в третьей — 80%, причем интен-

сивность линьки (здесь и далее под термином “интенсивность” понимается относительная площадь шкурки, затронутая линькой, то есть пигментированием) составляет в среднем 63%. В октябре линька прибылых продолжается. В первой декаде этого месяца линяет 85% исследованных обыкновенных бурозубок с интенсивностью 8–100%, в среднем 73%, а во второй — 50%, со средней интенсивностью 68% (3–100%). В третьей декаде октября линька прибылых заканчивается. Последние линявшие прибылые со шкурками, пигментированными на 3–5%, были пойманы 3 и 6.11.1959 г. и 2.11.2005 г. Волосы на шкурках зверьков, отловленных в начале ноября, были разными, то есть на одной и той же шкурке можно было встретить и летние зрелые волосы с луковичками закрытого типа, и волосы на стадии роста (интенсивно пигментированная прикорневая часть стержня волоса, луковичка открытого типа), и зрелые зимние волосы: шестисегментные остевые I порядка, семисегментные остевые II порядка и пуховые — все с закрытыми луковичками. Летние волосы постепенно выпадают, что подтверждается отсутствием их на шкурках зверьков из зимних и ранневесенних сборов, шерсть у таких землероек целиком состоит из зимних волос. Все это свидетельствует о полной смене волосяного покрова в период осенней линьки молодняка. Причем следует отметить необычайную стабильность сроков осенней линьки сеголеток всех видов рода *Sorex*, которые с удивительным постоянством повторяются из года в год.

Отсутствуют и географические различия. В Англии, Нидерландах, Польше, Германии, Финляндии и различных областях России (в Московской обл., в Татарстане, в Сибири и т.д.) осенью линька прибылых происходит в одни и те же сроки — в сентябре—октябре (Огнев, 1928; Жермозов, 1948; Строганов, 1957; Попов, 1960; Dehnel, 1949; Stein, 1954; Crowcroft, 1957; Skaren, 1964, 1973; Michielsen, 1966; Borowski, 1968).

Летней “промежуточной” линьки молодых зверьков, о которой пишет Штейн (Stein, 1954), мы ни у одного из исследованных видов землероек не обнаружили. Из 1873 сеголеток всех видов землероек-бурозубок, пойманных в июне—августе, лишь у 44 (2.3% от числа просмотренных) имелась темная точечная пигментация на мездre (интенсивность линьки не более 1%). Других признаков смены меха, в частности роста нового волоса, у них не было, так что считать их линяющими, очевидно, нет оснований. В нашем распоряжении материал позволяет установить приблизительный порядок смены меха на различных участках шкурки во время осенней линьки сеголеток (рис. 2). Судя про этим данным, начинается она обычно на спине у огузка и распространяется вперед к голове, переходя постепенно на бока и брюшко. Казалось бы, и волосы соответственно

Таблица 1. Интенсивность линьки обыкновенной бурозубки по месяцам

| Месяц      | Самцы                              |                       |                                                                                        | Самки                              |                       |                                                                                        |
|------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|            | число<br>исследованных<br>зверьков | из них<br>ляняющих, % | относительная<br>площадь<br>пигментированной<br>шкурки, %<br>от площади всей<br>шкурки | число<br>исследованных<br>зверьков | из них<br>ляняющих, % | относительная<br>площадь<br>пигментированной<br>шкурки, %<br>от площади всей<br>шкурки |
| Прибылые   |                                    |                       |                                                                                        |                                    |                       |                                                                                        |
| VI         | 15                                 | 8.8*                  | <1                                                                                     | 14                                 | 21.4*                 | <1                                                                                     |
| VII        | 310                                | 2.2*                  | <1                                                                                     | 249                                | 5.2*                  | <1                                                                                     |
| VIII       | 328                                | 0.3*                  | <1                                                                                     | 331                                | 0.9*                  | <1                                                                                     |
| IX         | 105                                | 74.3                  | 56                                                                                     | 62                                 | 71.0                  | 56                                                                                     |
| X          | 31                                 | 71.0                  | 67                                                                                     | 52                                 | 65.4                  | 46                                                                                     |
| XI         | 18                                 | 11.1*                 | <1                                                                                     | 22                                 | 4.5*                  | <1                                                                                     |
| XII        | 17                                 | 24.6*                 | <1                                                                                     | 13                                 | 38.5*                 | <1                                                                                     |
| I          | 14                                 | —                     | —                                                                                      | 13                                 | —                     | —                                                                                      |
| II         | 16                                 | 12.5*                 | <1                                                                                     | 1                                  | —                     | —                                                                                      |
| III        | 14                                 | —                     | —                                                                                      | 14                                 | —                     | —                                                                                      |
| Зимовавшие |                                    |                       |                                                                                        |                                    |                       |                                                                                        |
| IV         | 15                                 | 6.7                   | 20                                                                                     | 3                                  | 33.3                  | 30                                                                                     |
| V          | 7                                  | 47.0                  | 50                                                                                     | 7                                  | 28.5                  | 90                                                                                     |
| VI         | 29                                 | 24.1                  | 17                                                                                     | 14                                 | 14.2                  | 3                                                                                      |
| VII        | 48                                 | 14.6                  | 6                                                                                      | 61                                 | 16.5                  | 9                                                                                      |
| VIII       | 19                                 | 31.6                  | 2                                                                                      | 45                                 | 9.7                   | 22                                                                                     |
| IX         | 4                                  | 50.0                  | 28                                                                                     | 11                                 | —                     | —                                                                                      |
| X          | 3                                  | 66.6                  | 100                                                                                    | 6                                  | 50.0                  | <1                                                                                     |

Примечание: \* — случаи точечной линьки при общей площади пигментированной шкурки, не превышающей 1% от площади всей шкурки.

должны заканчивать рост сначала на спине, и в последнюю очередь на брюшке, однако при тщательном исследовании ноябрьских шкурок зрелые зимние волосы обнаруживались одновременно и на верхней, и на нижней стороне тела (на линии середины туловища). Возможно, это объясняется тем, что волосы всех категорий, растущие на спине, обычно превосходят по длине волосы на брюшке. Поэтому волосы на дорзальной стороне тела, хотя и пробиваются раньше, окончательной зрелости достигают одновременно с волосами нижней стороны тела (более длинные волосы дольше растут). В то же время описанный выше рисунок осенней линьки не всегда бывает достаточно четким еще и потому, что картина затушевывается неодновременным вступлением зверьков в линьку, а также многочисленными индивидуальными отклонениями.

Большинство авторов, обсуждая ход весенней линьки у мелких насекомоядных (Огнев, 1928; Кузнецов, 1952; Докучаев, 1981; Jackson, 1928;

Hamilton, 1940; Dehnel, 1949, 1950; Findley, Jones, 1956; Crowcroft, 1957; Meester, 1958; Williams, 1962; Michielsen, 1966 и др.), описывают волны длинного и короткого волоса, следующие друг за другом в особом порядке на разных участках тела зверька, но ничего не сообщают о потемнении мездры. Между тем, при рассмотрении осенней линьки они специально подчеркивают это явление. Все авторы единодушно отмечают, что осенняя линька начинается в крестцовой области и продолжается в направлении к голове, постепенно переходя на брюшную сторону. Весенняя же линька, наоборот, начинается с головы и распространяется к хвосту и брюху. Тем не менее, другие авторы (Попов, 1960; Scaren, 1973, 1979) утверждают, что весенняя линька обыкновенной бурозубки проходит в обратном порядке: начинается на брюшной стороне тела и заканчивается на спинной.

То, что весной не было замечено характерных изменений в коже (пигментации мездры), привело к рождению гипотезы, согласно которой у зем-



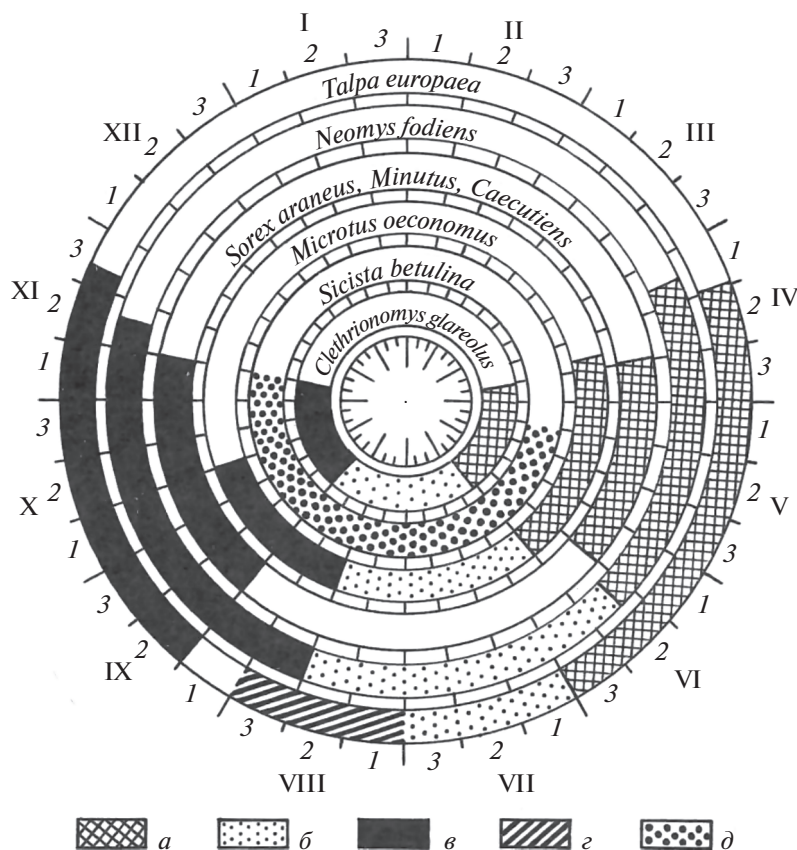


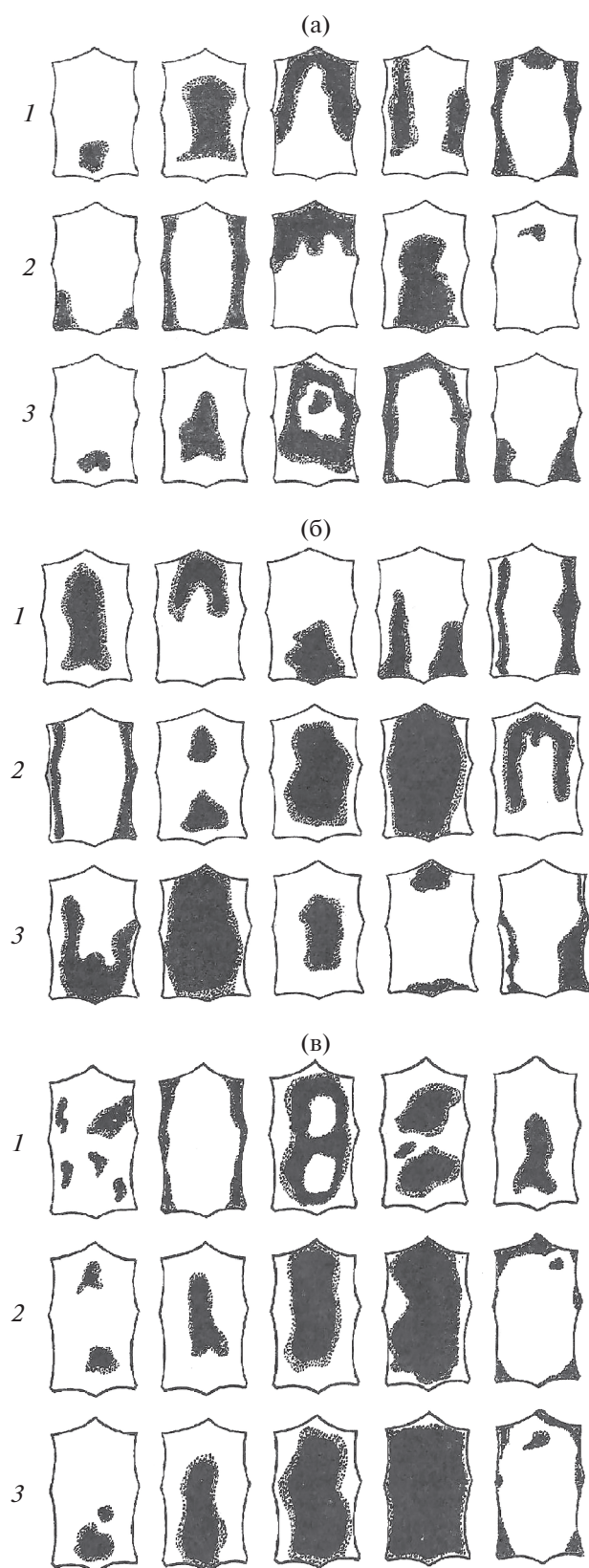
Рис. 1. Сроки линьки мелких насекомоядных и грызунов Карелии.

*a* — весенняя, *b* — ювенильная, *v* — осенняя, *g* — компенсаторная, *d* — летняя.

лероек нет нормальной весенней линьки (роста нового волоса), а происходит так называемая редукция — обламывание конечных сегментов зимних волос по перетяжкам и переход части остевых волос в пуховые (Borowski, 1952). Эту гипотезу критиковали более поздние исследователи (Шварц, 1955; Попов, 1960; Stein, 1954), имевшие в своих коллекционных сборах экземпляры в стадии нормальной весенней линьки с темными пятнами на мездре и ростом нового волоса. Случаи же, когда зверек имел одновременно короткий и длинный волос на разных частях шкурки (например, длинный на брюшке и короткий на спине) с резкой границей между ними, но без пигментации на мездре, они рассматривали как перерыв в линьке. Позже, отказавшись от гипотезы “редукции”, к этому пришел и Боровский (1968). Согласно его новым представлениям, волны короткого и длинного волоса дважды проходят по телу животного: один раз с брюшной стороны на спинную и вскоре после этого в обратном направлении — со спины на брюшко. В свете этих данных нетрудно примирить упомянутые выше высказывания относительно направления весенней линьки. Попов и Скарэн наблюдали первую фазу

весенней линьки, а Деннель, Кроукрофт и другие авторы — вторую фазу.

В более поздних обстоятельных работах Боровского (1968, 1973), получивших затем подтверждение в исследованиях ряда других зоологов (Ивантер, 1972, 2021; Докучаев, 1981; Stein, 1960), было показано, что у землероек-бурозубок весной бывает две следующие друг за другом линьки, различные по характеру, срокам и направлению, в котором они протекают. Весенняя линька I (ВЛ-I) заключается в смене шестисегментного зимнего волоса на пятисегментный весенний и проходит с брюшной стороны на спинную (рис. 2). В процессе весенней линьки II (ВЛ-II) этот пятисегментный весенний волос заменяется четырехсегментным летним. Начинается она на спине и заканчивается на брюшке. Эта линька может захватывать большую часть или всю шкурку животного (“полная линька”, по терминологии Боровского) или проходить в пределах узкой (1–5 мм шириной), постепенно перемещающейся полосы на шкурке (“волновая линька”). Кроме того, часто наблюдаются интервалы (перерывы) в линьке, и тогда землеройка может иметь одновременно длинный волос на одной части тела и короткий — на дру-



**Рис. 2.** Последовательность появления линных пятен у мелких насекомоядных млекопитающих. (а) — обыкновенная бурозубка, 1 — осенняя линька; 2 — весенняя I; 3 — весенняя II; (б) — водяная кутора; (в) — крот; 1 — ювенильная линька; 2 — весенняя; 3 — осенняя.

гой, без пигментации мездры. Такая “прерванная” линька наблюдается во время ВЛ-I у 40% особей, а ВЛ-II — у 22%.

Таким образом, рассмотренная выше картина двухэтапной весенней линьки перезимовавших зверьков по срокам и направлению соответствует ВЛ-I и ВЛ-II, описанным Боровским. Различна лишь трактовка этого явления. По Боровскому, у каждого зимовавшего зверька бывают две следующие друг за другом, но разграниченные во времени, весенние линьки I и II, при которых смена волос идет в противоположном направлении: сначала от живота к спине, а затем от спины к животу. Мы же считаем, что каждому зверьку свойственна лишь одна обычная (непрерывная) весенняя линька, а несовпадение ее сроков и хода у отдельных особей объясняется принадлежностью их к различным возрастным генерациям. Первыми начинают линьку пережившие зиму зверьки немногочисленных в наших условиях прошлогодних весенних пометов, то есть более старшие по возрасту. Они и претерпевают мнимую ВЛ-I. Что же касается второго этапа весенней линьки (по Боровскому — это ВЛ-II), то он соответствует массовой линьке особей поздних (летних) генераций. Иначе говоря, зимовавшие бурозубки вступают в весеннюю линьку в зависимости от своего календарного возраста как бы поэтапно. Это и создает ложное впечатление о существовании у одного и того же зверька двух последовательных весенних линек. К этой точке зрения приходят и некоторые другие исследователи, например Хивяринен с соавт. (Hyyvärinen et al., 1971).

И все же требует пояснения сравнительно небольшая доля линяющих особей в наших весенних сборах (за апрель—май — всего 21.8%). Причин здесь несколько. Во-первых, это частично обусловлено большой индивидуальной скоростью линьки. Специальные наблюдения показали, что землеройка может сменить весь свой шерстный покров за 2—5 дней (Wilke, 1938; Borowski, 1963). Таким образом, вероятность отлова линяющих особей сравнительно мала. Во-вторых, весенняя линька зверьков, как показали наблюдения польских зоологов за зверьками, содержавшимися в неволе, и в самом деле может перемежаться паузами (по Боровскому, это так называемая прерванная линька). Мездра в этих случаях непигментированная, хотя смена волосяного покрова еще не закончилась, о чем говорит наличие зимних и летних волос на одной и той же шкурке. Такие зверьки тоже не попадают в категорию линяющих. И, наконец, относительно небольшая доля линяющих особей в весенних уловах может быть связана с их пониженной активностью. Передвижения землероек с утолщенной в 4—5 раз в результате линьки кожей, по-видимому, более ограничены, поэтому вероятность их отлова уменьшается (Borowski, 1968).

В результате весенней линьки, как уже указывалось, происходит смена зимних волос (шестисегментных остевых I порядка, семисегментных остевых II порядка и семисегментных пуховых) летними: трехсегментными остевыми I порядка, четырехсегментными остевыми II порядка и четырехсегментными пуховыми. Соответственно (с удлинением на более короткие) изменяется и длина волос. К концу мая весенняя линька у землероек-бурозубок заканчивается, и зверьки добываются уже без пигментации на мездре, с коротким летним мехом (табл. 1). В последний раз зверьки с признаками весенней линьки пойманы 4.06.1967 г. и 8.06.1998 г. Со второй декады июня по середину сентября шерстный покров землероек-бурозубок, по-видимому, находится в состоянии покоя, о чем свидетельствует тонкая, светлая мездра, отсутствие линных пятен и прекращение роста волос всех категорий. На зрелость волоса указывают луковички — они закрытого типа.

По поводу осенней линьки землероек мнения различных исследователей в общем довольно близки (Огнев, 1928; Формозов, 1948; Ивантер, 1975; Докучаев, 1981). Все они сходятся на том, что она проходит в более узкие, чем весной, сроки и начинается на спине, близ основания хвоста, распространяется вперед к голове, а затем переходит на брюшко (рис. 2). Менее единодушны они в вопросе о так называемой промежуточной линьке. Например, согласно Штейну (Stein, 1954), небольшая часть популяции бурозубок, помимо нормальных весенней и осенней линек, проходит еще три: одну — в их первое лето, другую — во второе и последнюю (третью промежуточную) — незадолго до смерти, осенью (“старческая линька”). В отношении зимовавших особей существование старческой линьки, продолжающейся с мая по ноябрь, подтвердили исследования Боровского (Borowski, 1964). В то же время Кроуcroft (1957) полагает, что промежуточная летняя линька представляет собой задержавшуюся весеннюю или рано начавшуюся осеннюю. С этим согласен и Скарен (Skaren, 1964), такова и наша позиция.

Нормальной осенней линьки у зимовавших бурозубок не наблюдается, однако у них бывает так называемая старческая (“промежуточная” или “остаточная”) летне-осенняя линька, заключающаяся в росте нового короткого летнего волоса на некоторых частях тела, большей частью по его дорсальной стороне (Borowski, 1964). Длится эта линька с июня по октябрь, причем у некоторых особей она может проявиться сразу после завершения нормальной весенней линьки, а у других — после большого перерыва. В соответствии с этим намечаются два пика интенсивности старческой линьки: в июне и в сентябре—октябре, когда доля линяющих животных достигает 30–60%; в остальные месяцы она обычно не превышает 25% (табл. 1).

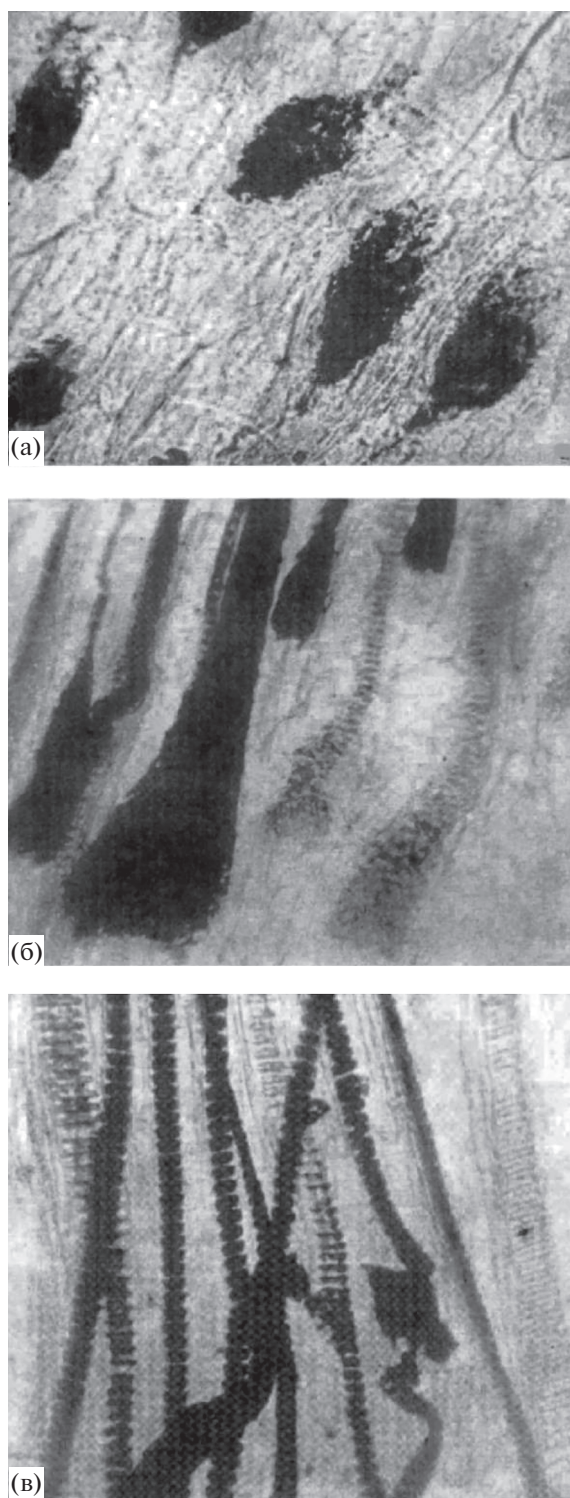
На основании полученных нами данных вполне можно сделать вывод об отсутствии существенных видовых различий в сроках, интенсивности и топографии сезонных линек (рис. 3). Между тем связь с полом, возрастом и состоянием популяции выступает достаточно отчетливо. Установлено, в частности, что весенняя линька у размножающихся самок начинается несколько раньше, чем у самцов и не участвующих в репродукции самок. Осенняя линька прибылых зверьков у всех *Soricidae* происходит в близкие сроки (сентябрь—октябрь) и заключается в смене коротких летних волос на более длинные и густые. Появлению новых волос предшествуют морфообразовательные процессы в коже (разрыхление, утолщение, пигментация). Начинаются они обычно на спине у огузка, далее распространяются вперед к голове, затем переходят на бока и заканчиваются на брюшке.

Весной, в апреле—мае линяют взрослые (перезимовавшие) особи. Смена волос начинается у них на брюшной стороне тела с постепенным охватом боков, а завершается — на спине или голове. Двухэтапный характер весенней линьки с противоположным направлением смены волос (у одних зверьков она идет от живота к спине, а у других — от спины к животу) мы, в отличие от Боровского (Borowski, 1968, 1973), объясняем не существованием двух весенних линек, а одновременным вступлением в линьку разных возрастных генераций. Первыми начинают линять особи прошлогодних весенних пометов, то есть более старшие по возрасту. Они и образуют мнимую ВЛ-I с характерным вентродорсальным направлением процесса. Что же касается второго этапа весенней линьки (по Боровскому, это ВЛ-II), то он соответствует массовой линьке зверьков поздних (летних) генераций и имеет дорсовентральный порядок смены волос. Настоящая осенняя линька у этих животных, видимо, вообще отсутствует. Вместо этого у них наблюдается старческая линька, затрагивающая, как правило, лишь отдельные участки и не имеющая четкого рисунка.

Напрашивается вывод о том, что у землероек-бурозубок любая сезонная линька — будь то весенняя или осенняя, если она первая в жизни зверька, начинается на спинной стороне тела, а если вторая — на брюшной. К отрицанию двух весенних линек приходят и финские исследователи (Huvärinen et al., 1971). Таким образом, землеройки-бурозубки претерпевают в условиях Севера две нормальные сезонные линьки (весеннюю и осеннюю), а также старческую. У водяной кутуры, помимо этого, имеется ювенильная линька, а у крота — компенсаторная.

Линьке мышевидных грызунов, особенно представителям родов *Clethrionomys* и *Microtus* (рыжие и серые полевки), в отличие от *Soricidae*,





**Рис. 3.** Закладка и рост волос при сезонной линьке: (а) — появление пигмента; (б) — образование луковиц новых волос; (в) — растущие волосы в толще кожи (микрофото. ув.  $\times 600$ ).

посвящена сравнительно более широкая литература (Крыльцов, 1958, 1959, 1962; Марвин, 1974; Громов, Поляков, 1977; Stein, 1938; Lehmann, 1962;

Mazak, 1962; Zejda, Mazak, 1965; Khateeb, Johnson, 1971a, 1971b, 1971c; Rowsemitt et al., 1975; Viro, 1979 и др.).

На основе изучения массовых видов грызунов Казахстана А. И. Крыльцов приходит к выводу об исключительной устойчивости и однообразии в последовательности смены волос у всех полевок Старого Света, которая почти не зависит от образа жизни зверьков. У обитателей суходольных и заболоченных лесов и лугов — рыжих, красных и темных (пашенных) полевок и полевок-экономок, у типичных полупустынных форм — общественных полевок, у полуводных — водяных крыс и ондатр, даже у таких специализированных подземных грызунов, как слепушонки, наблюдается один и тот же свойственный большинству изученных видов ход смены волос. Происходит она по сублатеральному (дорсальному) типу, при котором новые волосы появляются сначала на нижних частях боков и головы, затем процесс распространяется на брюшко и спину, и в последнюю очередь вылинивают верх головы и задняя часть спины. В общих чертах сублатеральный тип подраста волос сохраняется при всех видах возрастных и сезонных линек, варьирует только последовательность и скорость вылинивания головы, средней и задней части спины. Лишь у некоторых эндемичных для Сибири и Казахстана представителей рода *Clethrionomys* все или часть особей вида в период одной из сезонных линек сменяют мех по цефалосакральному типу. Порядок смены волос в этом случае — обратный описанному: начинается двумя овальными пятнами на задней части спины, затем переходит на голову и завершается на боках и брюшке. Старые зверьки у всех видов имеют диффузный тип линьки, при котором не наблюдается какой-либо закономерной последовательности в ее топографии (Крыльцов, 1962; Марвин, 1974; Громов, Поляков, 1977; Lehmann, 1962; Zejda, Mazak, 1965; Quay, 1968; Ling, 1970; Viro, 1979).

Проведенные нами исследования в общем подтверждают выводы названных выше авторов. Линька изученных нами грызунов близка по срокам и проходит по аналогичному плану (рис. 2, 4, табл. 2). Для всех полевок установлено существование трех линек: ювильной, которая в зависимости от времени рождения зверька может проходить весной, летом и осенью и завершается сменой детского волосяного покрова взрослым, и двух сезонных — весенней и осенней, сопровождающихся полной сменой волосяного покрова — соответственно на летний и зимний. Лесная мышовка, как, вероятно, и прочие зимоспящие млекопитающие, линяет почти весь бесснежный период с мая по октябрь, при этом линька, по видимому, протекает диффузно, во всяком случае, закономерный характер в смене волос установить у нее не удается.

Таблица 2. Встречаемость линяющих особей и интенсивность линьки рыжей полевки по месяцам

| Месяц                     | Самцы                              |                       |                                                                                        | Самки                              |                       |                                                                                        |
|---------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|                           | число<br>исследованных<br>зверьков | из них<br>линяющих, % | относительная<br>площадь<br>пигментированной<br>шкурки, %<br>от площади всей<br>шкурки | число<br>исследованных<br>зверьков | из них<br>линяющих, % | относительная<br>площадь<br>пигментированной<br>шкурки, %<br>от площади всей<br>шкурки |
| Прибылые ранних выводков  |                                    |                       |                                                                                        |                                    |                       |                                                                                        |
| VI                        | 28                                 | 82.1                  | 31.6                                                                                   | 17                                 | 76.4                  | 54.1                                                                                   |
| VII                       | 141                                | 91.4                  | 33.1                                                                                   | 77                                 | 69.0                  | 56.4                                                                                   |
| VIII                      | 55                                 | 87.3                  | 15.7                                                                                   | 35                                 | 65.7                  | 41.0                                                                                   |
| IX                        | 4                                  | 100.0                 | 23.0                                                                                   | 3                                  | 100.0                 | 16.3                                                                                   |
| Прибылые поздних выводков |                                    |                       |                                                                                        |                                    |                       |                                                                                        |
| VII                       | 56                                 | 62.5                  | 45.0                                                                                   | 47                                 | 29.8                  | 29.0                                                                                   |
| VIII                      | 77                                 | 66.2                  | 47.8                                                                                   | 60                                 | 68.3                  | 56.6                                                                                   |
| IX                        | 23                                 | 73.9                  | 53.5                                                                                   | 14                                 | 79.6                  | 44.0                                                                                   |
| X                         | 51                                 | 76.5                  | 23.8                                                                                   | 44                                 | 86.3                  | 27.4                                                                                   |
| XI– XII                   | 5                                  | —                     | —                                                                                      | 5                                  | —                     | —                                                                                      |
| Зимовавшие                |                                    |                       |                                                                                        |                                    |                       |                                                                                        |
| III                       | 3                                  | —                     | —                                                                                      | 2                                  | —                     | —                                                                                      |
| IV                        | 3                                  | 64.7                  | 16.0                                                                                   | 3                                  | 66.7                  | 10.0                                                                                   |
| V                         | 27                                 | 66.7                  | 4.9                                                                                    | 11                                 | 54.5                  | 22.5                                                                                   |
| VI                        | 20                                 | 85.0                  | 12.1                                                                                   | 11                                 | 45.4                  | 35.8                                                                                   |
| VII                       | 46                                 | 65.2                  | 8.0                                                                                    | 27                                 | 22.2                  | 6.4                                                                                    |
| VIII                      | 15                                 | 93.3                  | 9.3                                                                                    | 5                                  | 80.0                  | 10.0                                                                                   |

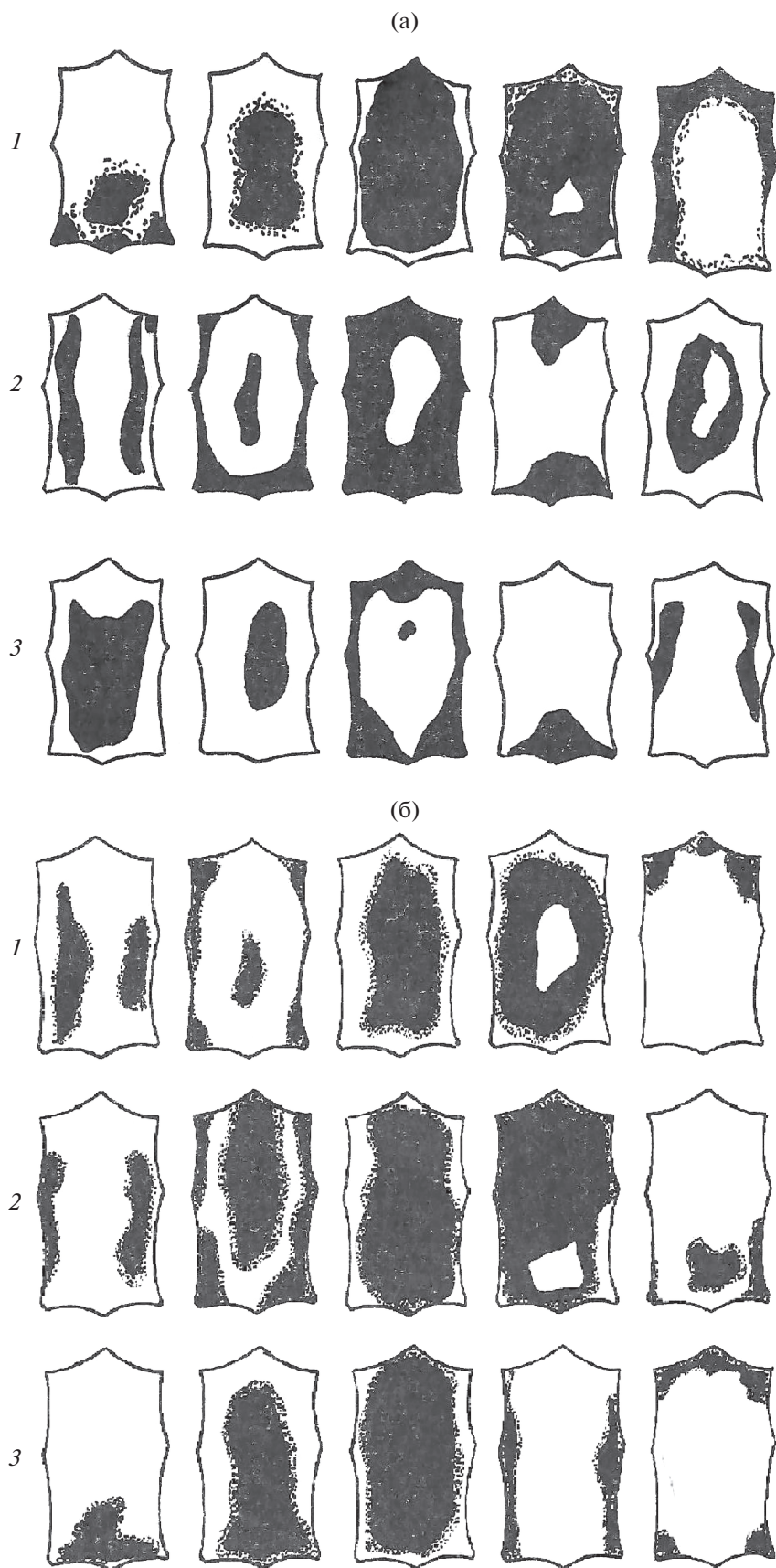
Примечание: степень пигментации мездры — относительная площадь пигментированной шкурки, % от всей шкурки.

Осенняя линька у всех грызунов проходит обычно более интенсивно, чем весенняя, сроки которой из-за неоднородности популяции в возрастном отношении крайне растянуты. Сроки и скорость линек зависят также от пола и физиологического состояния зверьков. Так, линька лактирующих самок запаздывает по сравнению с самками без признаков размножения, но начинается на 2–3 нед. раньше, чем у самцов. Ювенильная линька молодых поздних выводков обычно проходит быстрее, чем ранних, и тем не менее может переходить в осеннюю. Существенные коррективы в общий ход, темпы и порядок сезонной линьки вносят климатические условия года и состояние популяции (уровень численности и фаза популяционного цикла).

Наиболее четкая картина сезонных смен шерстного покрова вырисовывается на нашем материале для рыжей полевки, по которой удалось собрать наиболее богатый фактический материал. При этом сама шерсть этого грызуна значительно отличается от описанного выше волосяного покрова землероек и лесной мышовки не

только густотой и линейными размерами волос, но и формой волосяного стержня, его микроскопическим строением, а также групповым расположением волос на шкурке. Отсутствует характерная для насекомоядных сегментация волос. Стержни волос расположены наклонно к поверхности кожи и образуют отчетливые “потоки”, направленные к хвосту. Волосы растут пучками, состоящими из 2–4 пуховых или одного остевого и 2–3 пуховых волос, реже встречаются пучки из одних остевых. Вокруг каждого направляющего волоса группируются по 2–3 таких пучка, образуя сложные комплексы с различным сочетанием волос всех категорий. Мех — относительно длинный и густой. Окраска его яркая с заметным преобладанием темных, ржаво-коричневых и рыже-красных тонов на спине, рыже-серых на боках и светло-серых на брюшке, причем переходы в окраске различных частей тела постепенные.

По данным ряда авторов (Zejda, Mazak, 1965; Viro, Koskela, 1978; Viro, 1979), у рыжей полевки в течение жизни шерстный покров сменяется несколько раз. Первая ювенильная линька начина-



**Рис. 4.** Последовательность появления линных пятен у мелких грызунов. (а) — рыжая полевка; (б) — полевка-экономка; 1 — ювенильная линька, 2 — весенняя линька, 3 — осенняя линька.

ется в возрасте 5 недель. Вскоре после нее проходит постювенильная линька, в процессе которой редкий и короткий серовато-коричневый волос сменяется на летний у прибылых, родившихся весной и в начале лета, или на зимний — у родившихся в конце лета и осенью. В дальнейшем регулярная смена меха происходит весной и осенью. Она тесно связана с экологическими и внутренними факторами, половой активностью, беременностью и лактацией.

Наши исследования в целом подтверждают эти сведения (табл. 2, рис. 3). В условиях Карелии первую возрастную (ювенильную) линьку рыжие полевки претерпевают в полуторамесячном возрасте. Она связана, по-видимому с выходом из гнезд и переходом к более активному наземному образу жизни, в процессе которого зверьки подвергаются воздействию новых, более изменчивых экологических условий. Смена волос происходит почти одновременно по всей шкурке, но все-таки на вентральной стороне она начинается раньше. Согласно принятой номенклатуре (Крыльцов, 1962; Марвин, 1974; Lehmann, 1962; Ling, 1970; Viro, 1979), это так называемая дорсальная, или сублатеральная линька. Общая продолжительность ювенильной линьки не более 10 дней, и в результате у прибылых зверьков ранних выводков появляется постювенильный летний волосяной покров, а у поздних — взрослый летний или даже зимний.

Многие авторы связывают начало ювенильной линьки у полевок с наступлением половой зрелости (Ченцова, 1949; Огнев, 1950; Тупикова, 1971 и др.). Однако мы склонны разделить мнение А. И. Крыльцова (1958), который, опровергает эту точку зрения и приводит примеры возрастной (ювенильной) и даже одной из двух сезонных линек, наблюдаемых у зверьков задолго до их полового созревания.

После ювенильной линьки следует постювенильная (в процессе нее полевки весеннего и ранне-летнего поколения приобретают взрослый летний, а осенью — зимний волос), а затем сезонные — осенняя и весенняя (будущего года). При этом у прибылых самцов и самок ранних выводков ювенильная, постювенильная и осенняя линьки сменяют одна другую практически без перерыва, так что разграничить их сроки не удастся. То же можно сказать и о прибылых поздних выводках. В конце октября молодые полевки всех возрастов заканчивают линьку и в ноябре носят уже зимний наряд.

У зимовавших самцов весенняя линька, судя по изменению числа линяющих и интенсивности смены меха, очень растянута и проходит с середины апреля по конец июня, а разгар ее (линяет 65–100% зверьков со средней интенсивностью 5–25%) — с третьей декады мая по вторую декаду

июня. У самок линька начинается и проходит на 2–3 недели раньше — с начала апреля по май (67–100% линяющих с интенсивностью 10–52%), но захватывает и первую половину июня. В дальнейшем (в конце июня–июле) число линяющих среди зимовавших полевок сокращается, а затем, в августе, снова увеличивается, достигая 80–100%. Возможно, в конце лета у них начинается осенняя линька, но проверить это трудно, так как большинство зимовавших зверьков к сентябрю погибает.

В мае чаще всего попадались зверьки с темной мездрой на брюшке и боках и светлой — на спине. При этом подрост новых волос на брюшке составлял у них 2 мм, на боках — 1–1.8, а на спине новых волос еще не было и даже пигментация мездры обнаруживалась только при микроскопировании. Это свидетельствует о том, что весенняя линька начинается на вентральной стороне, а заканчивается — на дорсальной (рис. 3). У зимовавших самцов первыми весной линяют бока и конечности, затем сменяется шерсть на спине, брюшке и огузке. В июле линяют главным образом бока, а в августе — спина. У самок весенняя линька тоже начинается с боков, затем распространяется на брюшко и в последнюю очередь — на спину и голову. В июле у них линяют бока и плечи, а в августе — отдельные участки на брюшке и боках. Летняя смена волос у прибылых самцов ранних выводков начинается с боков, после чего распространяется на голову, плечи, спину и живот. У самок этой возрастной группы во время летней (ювенильной и постювенильной) линьки первым сменяется волос на брюшке и боках, а затем на остальной части тела, кроме спины, вылиняющей позднее.

Осенняя линька прибылых и зимовавших зверьков сопровождается полной сменой волосяного покрова и растянута с конца августа по октябрь включительно (табл. 2). Выпадение старых волос в этот период почти незаметно, так как идет медленно и начинается лишь после того, как длина новых волос достигнет уровня старых. Подрост зимнего меха при осенней линьке у половозрелых и неполовозрелых прибылых полевок начинается на боках с почти одновременным охватом спины. Затем линное пятно, распространяясь к голове, переходит на брюшную сторону и заканчивается в паховой области. Таким образом, последовательность осенней линьки прибылых особей в общих чертах соответствует порядку появления волос у новорожденных и относится к типичной для рыжих полевок дорсальной схеме. В то же время у прибылых самцов поздних выводков ювенильная смена шерстного покрова начинается нередко с боков и брюшка и заканчивается на спине, а осенняя — с огузка и отсюда постепенно переходит на остальную часть спины, голову, плечи, брюшко и бока (по цефальному и каудаль-



ному типу). У старых зверьков, родившихся в конце лета или осенью предыдущего года, подrost волос происходит ограниченными участками на различных частях тела и более всего подходит к диффузному или лоскутному типам линьки. Отсутствие четкой картины в последовательности осенней линьки можно объяснить варьированием ее сроков и растянутостью у отдельных зверьков (исходя из продолжительности линьки одной особи равной 15–18 дней), в результате чего разные топографические стадии смены волос накладываются друг на друга и затушевывают закономерный порядок линьки.

Общеизвестно, что одна из основных целей сезонных линек волосяного покрова млекопитающих заключается в адаптивных изменениях его свойств по сезонам, приводящим к соответствующей смене качеств меха и прежде всего его теплопроводности по сезонам. Это подтверждают и выполненные нами ранее исследования на мелких млекопитающих (Ивантер и др., 1985). Согласно этим данным, плотность волосяного покрова обыкновенной и других видов изученных бурозубок при смене на летний изменяется в основном за счет пуховых при сравнительно одинаковом количестве остевых и направляющих. Наблюдающееся же на протяжении всей жизни зверька закономерное изменение густоты волос при сохранении постоянного числа волосяных фолликулов Боровский (1958) связывает с эффектом Денеля — изменением массы и общей поверхности тела животных по сезонам (Dehnel, 1949).

В результате осенней линьки волосы становятся гуще, тоньше и почти в 2 раза длиннее. В то же время относительная толщина сердцевинного канала от лета к зиме заметно увеличивается: от 50–63% в бесснежный период до 62–84% зимой. При этом волосяной покров зверьков, отловленных летом, значительно ниже, чем у зимних. Пуховые волосы, входящие в состав летнего меха, — четырехсегментные, зимнего — семисегментные; остевые соответственно трех- и шестисегментные. В общем зимний мех выше летнего в 1.8–2 раза, причем длина концевой сегмента изменяется незначительно. Это относится и к другим категориям волос. При этом сезонные изменения высоты волосяного покрова связаны не только с изменением числа сегментов, но и их длины.

Мех водяной куторы достаточно густой, чтобы защитить ее от переохлаждения как в воде, так и на суше, но обращает внимание относительная его изреженность на брюшке, что, по-видимому, компенсируется большей толщиной растущих здесь волос. Впрочем, Б.Ф. Церевитинов (1958), упоминая, что у некоторых из представителей земноводных млекопитающих волосы на спине все-таки гуще, чем на других частях туловища, и объясняет это разной степенью приспособления

к водным условиям. Вероятно, к таким “некоторым” следует отнести и кутору. По сезонно густота волос у этого вида изменяется за счет пуховых. Наконец, характерным для куторы следует считать то, что в отличие от бурозубок, у которых остевые почти равны по толщине направляющим, у куторы они почти вдвое тоньше направляющих.

Сопоставление результатов наших измерений с данными В.Е. Соколова (1973) для кутор из разных регионов выявляет достаточно четкие географические различия рассматриваемого показателя. Согласно этим материалам (Ивантер и др., 1985), мех кутор Карелии состоит из наиболее длинных и соответственно наиболее тонких волос, что особенно важно для животным, обитающих у северных границ видового ареала в условиях постоянных термических дефицитов. Данные же по длине волос куторы показывают, что по крайней мере в летний период волосяной покров у нее значительно выше (“пышнее”), чем у землероек-бурозубок. В общем же у куторы длина волос всех категорий постепенно уменьшается с крестца и боков до спины и брюшка, что по номенклатуре Б.Ф. Церевитинова, соответствует эквалатеральному типу топографии волосяного покрова, характерному для большинства полуводных (“земноводных” — по терминологии автора) млекопитающих. У мелких грызунов к отмеченным выше особенностям сезонных линек следует добавить их растянутость и зависящую от участия в размножении четкую дифференцированность по возрастным генерациям.

*Теплозащитные свойства покровов,  
их изменения в процессе сезонной линьки  
и механизмы терморегуляции*

В процессе эволюции и освоения среды обитания мелкие млекопитающие таежного Севера приобрели целый ряд адаптаций, направленных в первую очередь на наиболее целесообразное, с наименьшими энергетическими затратами, поддержание теплового баланса организма со средой. Поскольку сохранение тепла за счет физической терморегуляции не требует дополнительных пищевых ресурсов, оно является основным способом экономии энергетических затрат (Jansky, 1967). В связи с этим эволюция терморегуляции идет в направлении замены химических механизмов физическими (Слоним, 1952, 1964, 1971; Шилов, 1962), о чем говорит и более отчетливая выраженность физической терморегуляции у типично субарктических и высокогорных видов (Шварц и др., 1968; Большаков, 1972).

Как известно, в системе приспособления млекопитающих к пониженным температурам важное место занимают реакции волосяного покрова. Многочисленными исследованиями показано,

что теплоизоляция пропорциональна густоте и толщине мехового покрова, и у мелких млекопитающих она ниже, чем у и более крупных (Калабухов, 1951, 1969; Слоним, 1952, 1971; Марвин, 1966; Большаков, Некрасов, 1968; Кривошеев и др., 1975; Давыдов, 1982; Hart, Heroux, 1955; Irving, 1964; Morrison, 1964 и др.). Чтобы иметь возможность успешно передвигаться, мелкие животные должны обладать тонким и легким волосяным покровом, а то, что шерсть у них по необходимости короче, снижает теплоизоляционные свойства покровов (Шмидт-Ниельсен, 1982).

Согласно современным представлениям, теплозащитные качества волосяного покрова зависят главным образом от образующегося в его толще “неподвижного” и “инертного” воздуха, исключая конвекционные токи и создающего эффективную тепловую изоляцию (Соколов, 1973). Чем пышнее и выше мех и тоньше волосы, тем больше воздушная прослойка между волосками и, следовательно, лучше сохраняется тепло. Имеет значение и строение волос — развитие сердцевин, содержащей теплоизолирующий воздух, наличие продольных бороздок на стержне, его конфигурация, число сегментов, способ укладки и т.п.

Связь теплоизоляционных свойств меха с морфологией и общим состоянием наружных покровов млекопитающих подтверждается экспериментальным определением коэффициента теплопроводности сухих коллекционных шкур зверьков, добытых в Карелии в разные сезоны года (табл. 3). Согласно этим данным, интегральная теплопроводность шерсти имеет достаточно четкие таксономические и сезонные различия, причем последние приобретаются в процессе сезонных линек.

Волосяной покров насекомоядных млекопитающих значительно уступает шерсти грызунов по высоте, но превосходит его по плотности. Кроме того, характерное для насекомоядных сегментированное строение волос, предотвращая сминание и обеспечивая укладку волос в любом направлении, способствует удержанию в нем неподвижного воздуха, что положительно сказывается на теплоизолирующих свойствах шкурки в целом и в значительной мере компенсирует общее несовершенство структуры их волосяного покрова.

Хорошо известно, что структура волосяного покрова млекопитающих зависит от сезона года: зимний мех гуще и длиннее и, как правило, лучше сохраняет тепло, чем более легкий (редкий и короткий) летний мех. Это сказывается и на уровне энергетического обмена. Тем не менее более совершенная терморегуляция организма “зимних” зверьков определяет специфику их адаптации к холоду: последняя обычно сопровождается не адекватным повышением теплопродукции, а значительным ограничением теплоотдачи (Слоним,

1964; Смирнов, 1968). Таким образом, улучшение теплоизоляционных свойств покровов в результате осенней линьки и обусловленное наступающими холодами снижение химической терморегуляции представляют собой общую закономерность (Слоним, 1961; Марвин, 1966; Смирнов, 1968; Калабухов, 1969; Башенина, 1966, 1977; Scholander et al., 1950; Hart, Heroux, 1953; Irving et al., 1955; Jung, 1964). И хотя это больше свойственно крупным животным, улучшение теплозащитных свойств зимнего меха и соответствующие сезонные изменения уровня теплоотдачи отмечены и у мелких млекопитающих (Лещинская, 1952; Волчанецкая, 1954; Смирнов, 1968; Калабухов, 1969; Башенина, 1977; Hammel, 1955; Irving, Krogh, 1955; Hart, 1956; Gębczyński, Olszewsky, 1963; Viro, 1979 и др.).

Согласно нашим измерениям (табл. 3), коэффициент теплопроводности летнего волосяного покрова по отношению к зимнему увеличивается (а теплоизоляция снижается) у обыкновенной буроzubки на 28.2%, средней — на 34.6, малой — на 26.8, у крота — на 30.2, у рыжей полевки — на 21.5, у полевки-экономки — на 30.9%. Это соответствует отмеченным выше сезонным изменениям длины и густоты меха.

Показатель ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ) между длиной волос и удельной теплопроводностью шкурки составил (по всему материалу) — 0.41 ( $t = 2.3$ ;  $p > 0.95$ ), что говорит о средней по силе, но статистически вполне достоверной связи. Еще теснее зависимость коэффициента теплопроводности от густоты меха:  $r_s = -0.66$  (при  $t = 3.6$ ;  $p > 0.99$ ). Коэффициент общей (совокупной) корреляции, оценивающий связь теплозащитных свойств шкурки с длиной и густотой волос вместе, составил 0.90 ( $p > 0.999$ ).

Таким образом, проведенные исследования убедительно показывают, что шкурки мелких зверьков в разгар линьки не только не уступают зимним по термозащитным свойствам, но даже превосходят их, о чем свидетельствует максимально низкий коэффициент теплопроводности (табл. 3). Как уже указывалось, это объясняется характерным для линьки значительным утолщением кожи и увеличением густоты меха за счет совмещения не выпавших, еще старых волос, с подрастающими новыми. Таким образом, вопреки распространенному мнению во время линьки, по крайней мере у мелких млекопитающих, механизмы физической терморегуляции не только не утрачивают своего значения, а, напротив, служат важным звеном в цепи гомеостатических реакций, направленных на снижение непроизводительных трат энергии и потери тепла в сложные для жизни зверьков переходные периоды. Более глубокая, чем в другие сезоны, реакция газообмена на воздействие холода указывает на то, что осе-

**Таблица 3.** Коэффициент теплопроводности ( $10^{-3}$  Вт/м К) сухих шкурок мелких млекопитающих Карелии

| Вид                    | Сезон | n  | Пределы   | $M \pm m$      |
|------------------------|-------|----|-----------|----------------|
| Обыкновенная бурозубка | Лето  | 16 | 38.2–50.0 | $47.6 \pm 0.8$ |
|                        | Зима  | 15 | 35.0–46.4 | $37.4 \pm 0.6$ |
|                        | Осень | 12 | 33.1–41.2 | $34.7 \pm 0.5$ |
| Средняя бурозубка      | Лето  | 16 | 50.0–60.0 | $54.0 \pm 1.2$ |
|                        | Зима  | 15 | 38.3–42.6 | $40.1 \pm 0.5$ |
|                        | Осень | 13 | 37.1–44.8 | $39.4 \pm 0.3$ |
| Малая бурозубка        | Лето  | 15 | 49.0–57.2 | $53.5 \pm 0.9$ |
|                        | Зима  | 14 | 38.0–49.0 | $42.2 \pm 0.5$ |
|                        | Осень | 9  | 36.0–45.0 | $39.0 \pm 0.4$ |
| Обыкновенная кутора    | Лето  | 18 | 30.0–42.1 | $32.5 \pm 0.9$ |
|                        | Осень | 14 | 28.0–39.0 | $30.3 \pm 0.8$ |
| Обыкновенный крот      | Лето  | 9  | 24.2–30.0 | $26.7 \pm 0.3$ |
|                        | Зима  | 8  | 19.0–22.4 | $20.5 \pm 0.3$ |
|                        | Осень | 8  | 18.9–21.0 | $19.1 \pm 0.3$ |
| Лесная мышовка         | Лето  | 22 | 48.0–50.3 | $48.6 \pm 0.3$ |
|                        | Осень | 4  | 37.9–38.2 | $38.1 \pm 0.4$ |
| Рыжая полевка          | Лето  | 20 | 45.2–53.1 | $49.8 \pm 0.9$ |
|                        | Зима  | 16 | 37.0–50.7 | $41.0 \pm 0.8$ |
|                        | Осень | 14 | 36.1–42.1 | $38.7 \pm 0.8$ |
| Полевка-экономка       | Лето  | 11 | 46.7–53.2 | $47.8 \pm 0.4$ |
|                        | Зима  | 5  | 34.1–38.4 | $36.5 \pm 0.4$ |
|                        | Осень | 8  | 34.1–40.9 | $36.1 \pm 0.6$ |

Примечание: зверьки, добытые осенью, находились в состоянии линьки.

нью грызуны и землеройки еще сохраняют определенные черты физиологической адаптации высоким летним температурам, и воздействие низких температур, усиленных повышенной влажностью воздуха, вызывает у них обостренную реакцию химической терморегуляции (Смирнов, 1968). Как считает сам П.К. Смирнов, такая реакция требует повышенных затрат энергии на избыточную теплопродукцию, необходимую для покрытия увеличенной потери тепла и, следовательно, для поддержания теплового баланса на уровне, обеспечивающем нормальную жизнедеятельность. Улучшение же теплоизоляционных свойств наружных покровов в период линьки в значительной мере компенсирует несовершенство химической терморегуляции и служит важным приспособлением для более рационального теплообмена организма при его физиологической перестройке в условиях неустойчивого температурного режима среды.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование посвящено мелким лесным млекопитающим — одной из наиболее типичных экологических групп, представляющих норно-наземных млекопитающих, или, как их еще называют, полунорников, мелких зверьков,

обитающих в лесной подстилке и ходах неглубоких нор, но нередко появляющихся и на поверхности почвы, то есть живущих здесь в условиях низких и весьма непостоянных температур. По образу жизни, условиям среды, а значит и по морфофизиологическим свойствам они совмещают в себе многие черты, характерные как для настоящих наземных, так и для специализированных подземных млекопитающих, и по существу представляют собой переходный адаптивный тип. В числе его важнейших адаптивных свойств — достаточно совершенная химическая терморегуляция, как известно, начинающаяся у гомойотермных животных лишь после того как исчерпываются возможности физической терморегуляции. Отсюда и особое значение, которое приобретает изучение особенностей механизмов физической терморегуляции у мелких млекопитающих — зверьков, характеризующихся высокой энергетикой при низкой индивидуальной стойкости организма к условиям внешней среды.

Обитая в умеренной и особенно холодной климатических зонах, в условиях низких и весьма изменчивых температур, эти животные приобрели легкий, не мешающий движениям, но достаточно теплый с высокими термоизоляционными свойствами волосяной покров, характеризующийся умеренной густотой и длиной волос, неравномер-

ностью опушения отдельных частей тела, а у землероек — еще и булавовидной удлиненной апикальной гранной и более сильным, чем у других групп животных, развитием сердцевинного канала. Тем не менее у мелких млекопитающих, как у животных с высоким потреблением энергии и недостаточно развитыми механизмами физической терморегуляции, сохранение температурного гомеостаза достигается в основном интенсификацией обменных процессов. Особенно велико значение химической терморегуляции для широко распространенных видов мелких млекопитающих, ареалы которых охватывают несколько ландшафтных зон (обыкновенная бурозубка, рыжая полевка). Между тем у животных-автохтонов Субарктики приспособления направлены на уменьшение энергетических затрат и связаны с хорошим развитием теплоизолирующих свойств наружных покровов (темная полевка, лесной и тундровый лемминг). Наконец у зимоспящих грызунов, то есть не нуждающихся зимой в эффективных механизмах физической терморегуляции, теплозащитная роль покровов в этот период сводится к нулю.

В этой связи в условиях Субарктики совершенствование энергетически выгодных и биологически целесообразных механизмов физической терморегуляции оказалось одним из основных направлений в эволюции адаптаций гомойотермных животных. Однако достигалось это разными путями. Выявленную многими исследователями высокую устойчивость северных млекопитающих к холодовым нагрузкам (отсюда крайне нижнее положение “критической точки” обмена), их способность длительное время поддерживать нормальную температуру тела при низких температурах без дополнительных энергетических затрат нельзя, конечно, объяснить одним лишь повышением теплоизоляционных свойств покровов. Не меньшую роль, очевидно, играют и биохимические адаптации, заключающиеся в способности поверхностных тканей организма к нормальному обмену при температурах, значительно более низких, чем сердцевины тела. Эффективность физической терморегуляции в качестве одного из важнейших компонентов адаптивного теплообмена продемонстрирована в процессе предпринятого нами исследования структуры и теплозащитных свойств покровов различных видов мелких насекомоядных и грызунов Карелии. Показано, в частности, что вопреки распространенному мнению во время линьки механизмы физической терморегуляции не только не утрачивают своего значения, а, напротив, служат важным звеном в цепи гомеостатических реакций, направленных на снижение непроизводительных трат энергии и потери тепла в сложные для жизни зверьков переходные периоды. В свою очередь это приводит к характерным изменениям

эколого-физиологических реакций — понижению уровня обмена, установлению и поддержанию постоянной температуры тела, сдвигам в деятельности эндокринной системы и т. д.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проводилась в плане выполнения Государственного задания Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

## 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

- Башенина Н.В. О сезонных изменениях химической терморегуляции у полевок // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1966. Т. 71. Вып. 3. С. 27–40.
- Башенина Н.В. Адаптивные особенности теплообмена мышевидных грызунов. М.: Наука, 1977. 294 с.
- Большаков В.Н. Пути приспособления мелких млекопитающих к горным условиям. М.: Наука, 1972. 100 с.
- Большаков В.Н., Некрасов Е.С. О теплоизоляционных свойствах наружных покровов горных грызунов // Науч. докл. высш. школы. Сер. биол. наук. 1968. № 10. С. 23–27.
- Волчанецкая Г.И. Сезонные изменения реакции некоторых видов полевок на влияние температуры среды // Уч. зап. Харьковск. ун-та. 1964. Вып. 52. С. 225–288.
- Громов И.М., Поляков И.Я. Полевки (Microtinae). Л.: Наука, 1977. 504 с.
- Давыдов А.Ф. Гомойотермные организмы бореальной климатической зоны // Экологическая физиология животных. Л.: Наука, 1982. Ч. 3. С. 110–130.
- Депарма Н.К. Линька кротов, ее последовательность и сроки // Тр. Всесоюз. научно-исслед. ин-та охотничьего хоз-ва. М., 1951. Вып. 10. С. 93–127.
- Докучаев Н.Е. Материалы по линьке средней (*Sorex saecutiens* Laxm.) и крупнозубой (*S. daphaenodon* Thomas) бурозубок на северо-востоке Сибири // Экология млекопитающих Северо-Восточной Сибири. М.: Наука, 1981. С. 22–32.
- Ивантер Т.В. Особенности линьки землероек Карелии // Науч. конф. биологов Карелии. Петрозаводск, 1972. С. 180–182.
- Ивантер Э.В. Очерки популяционной экологии мелких млекопитающих на северной периферии ареала. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2018. 770 с.
- Ивантер Э.В. Строение, теплозащитные свойства и линька волосяного покрова обыкновенной

- бурозубки (*Sorex araneus*) // Зоол. журн. 2021. Т. 100. № 4. С. 419–433.
- Ивантер Э.В., Ивантер Т.В., Туманов И.Л. Адаптивные особенности мелких млекопитающих. Л.: Наука, 1985. 318 с.
- Калабухов Н.И. Методика экспериментальных исследований по экологии наземных позвоночных. М.: Наука, 1951. 177 с.
- Калабухов Н.И. Периодические (сезонные и годовые) изменения в организме грызунов, их причины и последствия. Л.: Наука, 1969. 248 с.
- Когтева Е.З. Сезонная изменчивость и возрастные особенности строения кожи и волосяного покрова крота, зайца-беляка и енотовидной собаки // Промысловая фауна и охотничье хозяйство Северо-Запада РСФСР. Л.: Госиздат, 1963. С. 213–271.
- Кривошеев В.Г., Варич А.А., Уманцева Н.Д., Кривошеева В.П. Механизмы физической терморегуляции сибирского лемминга и субарктических популяций красной полевки и полевки-экономки // Мат. по экологии мелких млекопитающих Субарктики. Новосибирск: Наука, 1975. С. 110–144.
- Крыльцов А.И. Материалы по линьке мышевидных грызунов. Сообщение 1. Линька массовых видов полевых северного Казахстана // Зоол. журн. 1958. Т. 37. Вып. 2. С. 271–286.
- Крыльцов А.И. Материалы по линьке мышевидных грызунов. Сообщение 2. Линька различных представителей подсемейства полевых // Зоол. журн. 1959. Т. 38. Вып. 5. С. 745–755.
- Крыльцов А.И. Топография линьки грызунов и возможность использования ее в качестве таксономического признака // Тр. Ин-та защиты раст. КазССР. Алма-Ата, 1962. Т. 7. С. 418–451.
- Кузнецов Б.А. Товароведение пушно-мехового сырья СССР. М.: Заготиздат, 1932. 464 с.
- Кузнецов Б.А. Основы товароведения пушно-мехового сырья М.: Заготиздат, 1952. 508 с.
- Лещинская Е.М. Сезонные изменения кожного покрова млекопитающих // Зоол. журн. 1952. Т. 31. Вып. 3. С. 745–751.
- Марвин М.Я. Влияние внешней среды на строение меха млекопитающих // Уч. зап. Уральск. гос. ун-та. Сер. биол. Свердловск, 1966. Вып. 3. С. 52–57.
- Марвин М.Я. Строение и линька волосяного покрова грызунов Урала // Науч. тр. Свердловск. гос. пед. ин-та, 1974. Сб. 235. С. 11–22.
- Огнев С.И. Звери Восточной Европы и Северной Азии. Т. I. Насекомоядные и летучие мыши. М.-Л.: Главнаука, Госиздат, 1928. 632 с.
- Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран. М.-Л.: Академия Наук СССР, 1950. Т. 7. 706 с.
- Павлова Е.А. Сезонные изменения волосяного покрова зайца-беляка и прогноз сроков выходности меха // Тр. Всесоюз. научно-исслед. ин-та охотничьего хозяйства. 1951. Вып. 10. С. 59–77.
- Попов В.А. Млекопитающие Волжско-Камского края. Казань: Госиздат, 1960. 466 с.
- Слоним А.Д. Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. М.; Л.: Госиздат, 1952. 327 с.
- Слоним А.Д. Основы общей экологической физиологии млекопитающих. М.; Л.: Биомедгиз, 1961. 432 с.
- Слоним А.Д. О физиологических механизмах природных адаптаций животных и человека. М.; Л.: Госиздат, 1964. 64 с.
- Слоним А.Д. Экологическая физиология животных. Учебное пособие. М.: Высшая школа, 1971. 448 с.
- Смирнов П.К. Эколого-физиологические исследования некоторых видов грызунов. Л.: Изд. ЛГУ, 1968. 135 с.
- Соколов В.Е. Кожный покров млекопитающих. М.: Наука, 1973. 487 с.
- Соколов В.Е., Скурлат Л.Н., Степанова Л.В. и др. Руководство по изучению кожного покрова млекопитающих. М.: Наука, 1986. 279 с.
- Строганов С.У. Звери Сибири. Насекомоядные. М.: Изд. АН СССР, 1957. 267 с.
- Тупикова Н.В. Методы определения возраста грызунов в целях изучения возрастного состава их популяции // Тез. докл. II экол. конф. Киев, 1950. Ч. 2. С. 113–115.
- Фадеев Е.В. Строение меха нутрии // Тр. Всесоюз. научно-исслед. ин-та охотн. хоз-ва. М.: Заготиздат, 1955. Вып. 15. С. 93–104.
- Формозов А.Н. Мелкие грызуны и насекомоядные Шарьинского района Костромской области в период 1930–1940 гг. // Материалы по грызунам. М.: МОИП, 1948. Вып. 3. С. 3–110.
- Церевитинов Б.Ф., Кирсанов И.К., Бигман В.В. Товароведение животного сырья. М.: Госиздат, 1948. 248 с.
- Церевитинов Б.Ф. Топографические особенности волосяного покрова пушных зверей // Тр. ВНИИЖП. М., 1958. Вып. 17. С. 256–307.
- Ченцова Н.Ю. Определение возраста полевых (*Microtus gregalis* Pall.) по пластическим признакам // Тр. ВИЗР. Л., 1949. Вып. 2. С. 56–68.
- Чернова О.Ф., Целикова Т.Н. Атлас волос млекопитающих. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2004. 429 с.
- Шварц С.С. Биология землероек лесостепного Зауралья // Зоол. журн. 1955. Т. 34. Вып. 3. С. 915–927.
- Шварц С.С., Смирнов В.С., Добринский Л.Н. Метод морфофизиологических индикаторов в экологии наземных позвоночных. Свердловск: Госиздат, 1968. 387 с.
- Шилов И.А. О некоторых понятиях, связанных с изучением проблемы терморегуляции // Зоол. журн. 1962. Т. 41. Вып. 4. С. 491–497.
- Шмидт-Нюельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда: В 2 кн. М.: Мир, 1982. 785 с.
- Borowski S. Sezonowe zmiany u wlosien i Soricidae // Ann. Univ. M. Curie-Sklod. Sect. C. 1952. V. 7. № 2. S. 65–117.
- Borowski S. Variation in density of coat during the life cycle of *Sorex araneus araneus* Linnaeus, 1758 // Acta Theriol. 1958. V. 2. № 14. P. 286–289.
- Borowski S. Old-age moult in the common shrew, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 // Acta Theriol. 1963. V. 7. № 19. P. 374–375.
- Borowski S. Moults of shrews (*Sorex* L.) under laboratory conditions // Acta Theriol. 1964. V. 8. № 8. P. 125–135.

- Borowski S.* On the moult in the common shrew // *Acta Theriol.* 1968. V. 13. № 30. P. 483–498.
- Borowski S.* Variations in coat and colour in representatives of the genera *Sorex* L. and *Neomys* Kaup. // *Acta Theriol.* 1973. V. 18. № 14. P. 247–279.
- Crowcroft P.* The life of the shrew. L.: M. Reinhardt, 1957. 166 p.
- Dehnel A.* Studies in the genus *Sorex* L. // *Ann. Univ. M. Curie-Sklod. Sect. C.* 1949. V. 4. № 2. S. 17–102.
- Dehnel A.* Studies on the genus *Neomys* Kaup // *Ann. Univ. M. Curie-Sklod. Sect. C.* 1950. V. 5. № 1. S. 1–63.
- Findley J.S., Jones J.K.* Moults of the short-tailed shrew, *Blarina brevicauda* // *Amer. Midl. Nat.* 1956. V. 56. № 1. P. 246–249.
- Gębczyński M., Olszewski J.* Katathermometric measurements of insulating properties of the fur in small mammals // *Acta Theriol.* 1963. V. 7. № 19. P. 369–371.
- Hammel H.T.* Thermal properties of fur // *Amer. J. Physiol.* 1955. V. 182. P. 369–376.
- Hamilton W.J.* The moult of *Blarina brevicauda* // *J. Mammal.* 1940. V. 21. № 4. P. 457–458.
- Hart J.S.* Seasonal changes in insulation of the fur // *Canad. J. Zool.* 1956. V. 34. № 1. P. 53–57.
- Hart J.S., Heroux O.* Exercise and temperature regulation in lemming and rabbits // *Canad. J. Biochem. Physiol.* 1955. V. 33. № 3. P. 528–532.
- Hyvärinen H.* On the seasonal changes in the skeleton shrew (*Sorex araneus* L.) and their physiological background // *Aquil. Ser. Zool.* 1969. V. 7. P. 1–32.
- Hyvärinen H., Peltari A., Saure L.* Seasonal changes in the histology and alkaline phosphatase distribution of the skin of the common shrew and of the bank vole as a function of hair cycle // *Aquil. Ser. Zool.* 1971. V. 12. P. 43–52.
- Irving L.* Terrestrial animals in cold: birds and mammals // *Handbook of physiology. Sect. 4. Adaptation to environment.* Washington, 1964. P. 361–378.
- Irving L., Krog J.* Temperature of skin in the arctic as a regulator of heat // *J. Appl. Physiol.* 1955. V. 7. P. 355–364.
- Irving L., Krogh H., Monson M.* The metabolism of some alaskan animals in winter and summer // *Physiology.* 1955. V. 28. № 3. P. 173–185.
- Jackson H.H.T.* A taxonomic review of the American long-tailed shrew // *North Amer. Fauna.* 1928. V. 51. P. 1–30.
- Jansky L.* Evolutionary adaptations of temperature regulation in mammals. *Cond. Z. Saugetier-Kunde*, 1967. B. 32. № 3. P. 167–172.
- Jung K.D.* Untersuchungen über Wärmestrahlungsmechanismen an Säugerintegumenten und ihre Biologische Bedeutung // *Zool. Jahrb. Abt. I.* 1964. B. 91. № 4. S. 56–74.
- Khateeb A.A., Johnson E.* Seasonal changes of pelage in vole (*Microtus agrestis*). I. Correlation with changes in the endocrine glands // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1971a. V. 16. P. 217–228.
- Khateeb A.A., Johnson E.* Seasonal changes of pelage in the vole (*Microtus agrestis*). II. The effect of daylength // *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1971b. V. 16. P. 239–235.
- Khateeb A.A., Johnson E.* Seasonal changes of pelage in the vole (*Microtus agrestis*). III. The role of the endocrine system // *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1971c. V. 16. P. 236–240.
- Lehmann von E.* Über die Seitendrüsens der Mitteleuropäischen Rotelmaus (*Clethrionomys glareolus* Schreber) // *Z. Morphol. Okol. Tiere.* 1962. B. 51. S. 335–344.
- Ling J.K.* Pelage and moulting in wild mammals with special reference to aquatic forms // *Quart. Rev. Biol.* 1970. V. 45. P. 16–54.
- Mazak V.* Zur Kenntnis der Postnatalen Entwicklung der Rotelmaus, *Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780 (Mammalia, Microtidae) // *Acta Soc. Zool. Baemoslov.* 1962. B. 26. S. 77–104.
- Meester J.* The fur and moult in the shrew, *Myosorex cafer* // *J. Mammal.*, 1958. V. 39. № 4. P. 494–498.
- Michielsen N.C.* Intraspecific and interspecific competition in the shrews *Sorex araneus* L., and *S. minutus* L. // *Arch. Neerland Zool.* V. 17. № 1. P. 73–174.
- Morrison P.* Adaptation of small mammals to the arctic // *Fed. Proc.* 1964. V. 23. № 6. P. 1292–1206.
- Quay W.B.* The specialized posterolateral sebaceous glandular regions in microtine rodents // *J. Mammal.* 1968. V. 49. P. 427–445.
- Rowsemitt C., Kunz T.N., Tamarin R.H.* The timing and patterns of moult in *Microtus breweri* // *Oecas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas*, 1975. V. 34. P. 1–11.
- Scholander P.F., Hock R., Walters W., Irving L.* Heat regulation in same arctic and tropical mammals and birds // *Biol. Bull.* 1950. V. P. 237–258.
- Skaren U.* Variation in two shrews, *Sorex unguiculatus* Dobson and *S. a. araneus* L. // *Ann. Zool. Fenn.* 1964. V. 1. № 2. P. 94–124.
- Skaren U.* Spring moult and onset of the breeding season of the common shrew (*Sorex araneus* L.) in the Central Finland // *Acta Theriol.* 1973. V. 18. № 23. P. 443–458.
- Stein G.H.W.* Biologische Studien an Deutschen Kleinsäugern // *Arch. Naturgesch.* 1938. B. 7. № 4. S. 477–513.
- Stein G.H.W.* Materialien zum Haawechsel Deutscher Insectivoren // *Mitt. Zool. Mus. Berlin.* 1954. B. 30. S. 12–34.
- Stein G.H.W.* Zum Haarwechsel der Feldmaus (*Microtus arvalis*) und Weiterer Murroidea // *Acta Theriol.* 1960. V. 4. № 6. P. 12–34.
- Viro P.* Moulting and structure of the fur in the bank vole, *Clethrionomys glareolus* (Schreber 1780), in the vicinity of Oulu, Finland // *Aquil. Ser. Zool.* 1979. V. 19. P. 49–58.
- Viro P., Koskela P.* Moults topography, moulting and the structure of the fur in the harvest mouse // *Acta Theriol.* 1978. V. 23. № 34. P. 503–517.
- Wilke G.* Freilands- und Gefangenschaftsbeobachtungen an *Sorex araneus* L. // *Z. Saugetierk.* 1938. B. 12. S. 332–335.
- Williams L.W.* Moults in *Blarina brevicauda* // *J. Mammal.* 1962. V. 43. № 3. P. 423–424.
- Zejda J., Mazak V.* Cycle de changement du pelage chez le campagnol roussatre, *Clethrionomys glareolus* Schreber 1780 (Microtidae, Mammalia) // *J. Mammalia.* 1965. V. 29. P. 577–597.



## **Molting Study of the Hair Cover of Small Forest Mammals (Experience of Analytical Review of the Problem)**

**E. V. Ivanter<sup>a, b, \*</sup>**

<sup>a</sup>*Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia*

<sup>b</sup>*Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia*

*\*e-mail: Ivanter@petrsu.ru*

For small insectivores and rodents that exist under conditions of constant thermal deficits and spend a lot of time in the forest floor and burrows, these animals constantly contact hard substrate and therefore a regular change of fur is of particularly important. According to the results of the studies, the timing and intensity of molting change depending on the environmental conditions and the physiological state of the animals. The results show a specific replacement of pelage and a rate of hair change in individuals of different sex and age groups. This can serve as an indicator of the state of the entire population or signal of serious deficits of an important ecological, physiological or population processes. Collected data indicates that there are no significant differences between species in the timing, intensity, and scheme of seasonal molting. It is rather coordinated by sex, age, and condition of the population. During the studies of the most common species, shrews and rodents in Karelia, we revealed a stability and uniformity in the sequence of the molting, which does not depend on the lifestyle of the animals. In most species, molting occurs in a sublateral (dorsal) scheme, in which the new hair appears first on the lower parts of the sides and head, after in abdomen and back, and molting finishes on top of the head and in the back.

**Keywords:** replacement of the pelage, intensity and topography of the seasonal change of fur, thermal protection properties of fur