

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 501, 2021

- Раннеплейстоценовая белозубка *Crocidura kornfeldi* (Lipotryphla, Soricidae) из Крыма  
*А. В. Лопатин, А. С. Тесаков* 499
- Новый вид *Turphlomys* (Platacanthomyidae, Rodentia) из среднего плейстоцена северного Вьетнама  
*А. В. Лопатин* 505
- Раннеплейстоценовая рысь *Lynx issiodorensis* (Felidae, Carnivora) из пещеры Таврида, Крым  
*А. В. Лавров, Д. О. Гимранов, Б. А. Вахрушев, А. В. Лопатин* 511
- Первая находка погонофор (Annelida, Siboglinidae) в Восточно-Сибирском море совпадает с районами метановых просачиваний  
*Н. П. Карасева, Н. Н. Римская-Корсакова, И. А. Екимова, В. Н. Кокарев, М. И. Симаков, М. М. Ганцевич, В. В. Малахов* 517
- Новые морфофункциональные критерии профиля устойчивости при моделировании посттравматического стрессового расстройства – триггера дисфункции надпочечников  
*М. В. Кондашевская, М. В. Комелькова, В. Э. Цейликман, О. Б. Цейликман, К. А. Артемьева, В. В. Алексанкина, М. Н. Болтовская, А. П. Сарapultцев, П. Н. Попков, М. В. Черешнева, В. А. Черешнев* 522
- Ген *piragua* не является важным для развития дрозофилы  
*В. В. Соколов, П. Г. Георгиев, О. В. Кырчанова* 528
- Активность  $Na^+/K^+$ -АТФазы у смолтов горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum, 1792) бассейна Белого моря при содержании в садках с пресной, эстуарной и морской водой  
*Е. И. Кяйвярайнен, Н. Л. Рендаков, Д. А. Ефремов, Н. Н. Немова* 532
- Метаболические свойства активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию  
*В. В. Власова, Е. В. Сайдакова, Л. Б. Королевская, Н. Г. Шмагель, В. А. Черешнев, К. В. Шмагель* 538
- Особенности иммуногематологических параметров перелетного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) и оседлого (*Myotis dasycneme* Voie, 1825) видов рукокрылых фауны Урала  
*Л. А. Ковальчук, В. А. Мищенко, Л. В. Черная, В. Н. Большаков* 543
- Влияние полиметаллического загрязнения на ионообменные свойства клеточных стенок корней и побегов ячменя  
*Н. Р. Мейчик, Ю. И. Николаева, О. В. Никушин, М. А. Кушунина* 547
- Пероксид-индуцированная окислительная модификация плазминогена  
*А. Д. Васильева, В. С. Иванов, Л. В. Юрина, М. И. Индейкина, А. Е. Бугрова, А. С. Кононихин, Е. Н. Николаев, М. А. Розенфельд* 551

Фемтосекундное излучение низкой интенсивности активирует естественную защиту организма мышей <i>in vivo</i>	
<i>Г. Р. Иваницкий, С. И. Заичкина, А. Р. Дюкина, В. И. Юсупов, С. С. Сорокина, О. М. Розанова, Е. Н. Смирнова, Д. П. Ларюшкин, Н. В. Минаев, М. М. Поцелуева</i>	557
Сравнительное исследование содержания липидов у молоди <i>Leptoclonus maculatus</i> из Конгсфьорда и Рипфьорда арх. Шпицберген	
<i>Н. Н. Немова, С. Н. Пеккоева, В. П. Воронин, Т. Р. Руоколайнен, S. Falk-Petersen, J. Berge, С. А. Мурзина</i>	563
Влияние альфа-фетопротейна на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток	
<i>С. А. Заморина, К. Ю. Шардина, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, С. В. Ужвиюк, М. Б. Раев, В. А. Черешнев</i>	569
Взаимодействие наночастиц оксида графена с клетками линии Jurkat в системе Cell-IQ	
<i>С. А. Заморина, П. В. Храмцов, М. Б. Раев, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, А. И. Нечаев, Е. О. Шунькин, О. Г. Хазиахматова, В. В. Малащенко, Л. С. Литвинова</i>	573
Адаптация к антимикробным препаратам и патогенность микоплазм: развитие устойчивости к ципрофлоксацину и эволюция вирулентности у <i>Acholeplasma laidlawii</i>	
<i>Е. С. Медведева, А. А. Музыкантов, В. В. Костенко, Н. Б. Баранова, М. И. Маркелова, Р. Г. Сабуни, Д. Р. Хуснутдинова, О. А. Чернова, В. М. Чернов</i>	580
Целомическая система представителя морских ежей <i>Strongylocentrotus pallidus</i> (Echinodermata, Echinoidea) и проблема целомической метамерии у иглокожих	
<i>О. В. Ежова, Ю. А. Кокуркина, К. И. Белолобская, В. В. Малахов</i>	586

---

---

# CONTENTS

---

---

Vol. 501, 2021

---

---

- Early Pleistocene White-toothed Shrew *Crocidura kornfeldi* (Lipotyphla, Soricidae) from Crimea  
*A. V. Lopatin and A. S. Tesakov* 499
- A New Species of *Typhlomys* (Platacanthomyidae, Rodentia) from the Middle Pleistocene of Northern Vietnam  
*A. V. Lopatin* 505
- Early Pleistocene *Lynx issiodorensis* (Felidae, Carnivora) from the Taurida Cave, Crimea  
*A. V. Lavrov, D. O. Gimranov, B. A. Vakhrushev, and A. V. Lopatin* 511
- The First Discovery of *Pogonophores* (Annelida, Siboglinidae) in the East Siberian SEA Coincides with the Areas of Methane Seeps  
*N. P. Karaseva, N. N. Rimskaya-Korsakova, I. A. Ekimova, V. N. Kokarev, M. I. Simakov, M. M. Gantsevich, and V. V. Malakhov* 517
- New Morphofunctional Criteria for Profile Resistance in Modeling Post-Traumatic Stress Disorder as Adrenal Dysfunction Trigger  
*M. V. Kondashevskaya, M. V. Komelkova, V. E. Tseylikman, O. B. Tseylikman, K. A. Artem'yeva, V. V. Aleksankina, M. N. Boltovskaya, A. P. Sarapultsev, P. N. Popkov, M. V. Cheresheva, and V. A. Chereshev* 522
- Piragua Gene is not Essential for *Drosophila* Development  
*V. V. Sokolov, P. G. Georgiev, and O. V. Kyrchanova* 528
- Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Smolts of Pink Salmon *Oncorhynchus gorbusha* (Walbaum, 1792) of the White Sea Basin when Kept in Fish Traps with Fresh, Estuarine, and Sea Water  
*E. I. Kaivarainen, N. L. Rendakov, D. A. Efremov, and N. N. Nemova* 532
- Metabolic Features of Activated Memory CD4<sup>+</sup> T-cells Derived from HIV-Infected Immunological Non-responders to Highly Active Antiretroviral Therapy  
*V. V. Vlasova, E. V. Saidakova, L. B. Korolevskaya, N. G. Shmagel, V. A. Chereshev, and K. V. Shmagel* 538
- Features of Immunohematological Parameters of Migratory (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) and Resident (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) Bat Species of the Ural Fauna  
*L. A. Kovalchuk, V. A. Mishchenko, L. V. Chernaya, and V. N. Bolshakov* 543
- The Effect of Polymetallic Pollution on Ion-exchange Properties of Barley Root and Shoot Cell Walls  
*N. R. Meychik, Yu. I. Nikolaeva, O. V. Nikushin, and M. A. Kushunina* 547
- Peroxide-Induced Damage to Plasminogen Molecules  
*A. D. Vasilyeva, V. S. Ivanov, L. V. Yurina, M. I. Indeykina, A. E. Budrova, A. S. Kononikhin, E. N. Nikolaev, and M. A. Rosenfeld* 551

Low-Intensity Femtosecond radiation Activates the Natural Defenses of Mice <i>in vivo</i>	
<i>G. R. Ivanitskii, S. I. Zaichkina, A. R. Dyukina, V. I. Yusupov, S. S. Sorokina, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, D. P. Laryskin, N. V. Minaev, and M. M. Potselueva</i>	557
Comparative Study of Lipid Content in <i>Leptoclinus maculatus</i> Postlarvae from Kongsfjord and Rjipfjord arch. Spitsbergen	
<i>N. N. Nemova, S. N. Pekkoeva, V. P. Voronin, T. R. Ruokolainen, S. Falk-Petersen, J. Berge, and S. A. Murzina</i>	563
Effect of Alpha-fetoprotein on the Differentiation of Myeloid Suppressor Cells	
<i>S. A. Zamorina, K. Yu. Shardina, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, S. V. Uzhviyuk, M. B. Rayev, and V. A. Chereshev</i>	569
Graphene Oxide Nanoparticles Interaction with Jurkat Cell Line in Cell-IQ System	
<i>S. A. Zamorina, P. V. Khramtsov, M. B. Rayev, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, A. I. Nechaev, E. O. Shunkin, O. G. Khaziakhmatova, V. V. Malashchenko, and L. S. Litvinova</i>	573
Adaptation to Antimicrobials and Pathogenicity in Mycoplasmas: Development of Ciprofloxacin-resistance and Evolution of Virulence in <i>Acholeplasma laidlawii</i>	
<i>E. S. Medvedeva, A. A. Mouzykantov, V. V. Kostenko, N. B. Baranova, M. I. Markelova, R. G. Sabouni, D. R. Khusnutdinova, O. A. Chernova, and V. M. Chernov</i>	580
Coelomic System of the Sea Urchin <i>Strongylocentrotus pallidus</i> (Echinodermata, Echinoidea) and the Problem of Coelomic Metamerism in Echinoderms	
<i>O. V. Ezhova, J. A. Kokurkina, K. I. Belolubskaya, and V. V. Malakhov</i>	586

---

УДК 569.33:551.793(477.75)

## РАННЕПЛЕЙСТОЦЕНОВАЯ БЕЛОЗУБКА *CROCIDURA KORNFELDI* (LIPOTYPHILA, SORICIDAE) ИЗ КРЫМА

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин<sup>1,\*</sup>, А. С. Тесаков<sup>2</sup>

Поступило 10.06.2021 г.

После доработки 05.07.2021 г.

Принято к публикации 06.07.2021 г.

Из нижнеплейстоценовых отложений пещеры Таврида в центральном Крыму (Белогорский район, пос. Зуя) описаны остатки белозубки *Crocidura kornfeldi* Kormos, 1934 (фрагмент черепа с почти полными зубными рядами, фрагмент ростральной части черепа с левым резцом, фрагмент верхнечелюстной кости, пять фрагментов нижних челюстей и изолированный верхний резец). Этот древнейший европейский вид землероек рода *Crocidura* был обычен в раннем плейстоцене Центральной Европы и Средиземноморья; из Крыма и Восточной Европы в целом описывается впервые.

**Ключевые слова:** *Crocidura kornfeldi*, Soricidae, Lipotyphla, землеройки, ранний плейстоцен, Крым, пещера Таврида

**DOI:** 10.31857/S268673892106010X

*Crocidura* – самый богатый по современному видовому разнообразию род в классе млекопитающих (около 200 видов, обитающих в Евразии и Африке) [1, 2]. В настоящее время ископаемые остатки (фрагменты верхних и нижних челюстей и изолированные зубы) древнейших представителей этой филетической линии белозубок известны из среднемиоценовых отложений возрастом 14 млн лет на плато Потвар в Пакистане [3: cf. *Crocidura* sp.]. До этих находок преобладали гипотезы о возможном возникновении рода в Африке [4, 5] или Малой Азии [6]. Самые древние европейские формы *Crocidura* известны из базального плейстоцена (MN17, возраст около 2.3 млн лет) Центральной и Южной Европы; они относятся к виду *Crocidura kornfeldi*, который рассматривается как первый представитель рода, колонизировавший Европу [4–6]. В Восточной Европе древние белозубки указывались из раннего плейстоцена местонахождений Тарханкут в Крыму [7] и Тиздар на Таманском п-ве [8].

В настоящей статье приводится первое детальное описание *C. kornfeldi* из Крыма и Восточной Европы в целом. Оно основано на находках остатков мелкой землеройки с беспигментными

зубами (фрагмент черепа с почти полными зубными рядами, фрагмент ростральной части черепа с левым резцом, фрагмент верхнечелюстной кости, пять фрагментов нижних челюстей и изолированный верхний резец) в нижнеплейстоценовых отложениях пещеры Таврида в центральном Крыму (Белогорский район, пос. Зуя). Возраст фаунистического комплекса местонахождения Таврида ранее был определен в рамках позднего виллафранка, около 1.8–1.5 млн л.н. [9].

Раннеплейстоценовая фауна мелких млекопитающих из пещеры Таврида по нашим предварительным данным включает также *Erinaceus* sp., *Beremendia fissidens* (Petényi, 1864), *Hypolagus brachygnathus* (Kormos, 1930), *Lepus* sp., *Spermophilus nogaici* (Topachevsky, 1957), *Hystrix (Acanthion) vinogradovi* Argyropulo, 1941, *H. (H.) refossa* Gervais, 1852, *Sicista* sp., *Apodemus* sp., *Allocricetus ehiki* Schaub, 1930, *Cricetus* sp., *Clethrionomys* sp., *Ellobius kujalnikensis* Topachevsky, 1965, *Lagurodon aranka* (Kretzoi, 1954), *Miomys* sp., *Allophaiomys deucalion* Kretzoi, 1969 [см. также 10–12].

Описанный ниже материал по *C. kornfeldi* из пещеры Таврида хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве. Терминология и методика измерения зубов и челюстей по Й. Рёймеру [4], с изменениями [13]. Размеры в мм. Обозначения измерений: AW – передняя ширина, BL – лабиальная длина, H – высота, HC – высота сочленовного мышцелка, L – длина, LL – лингвальная длина, LLF – длина нижней фасетки сочленовного мышцелка,

<sup>1</sup> Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Геологический институт Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: alop@paleo.ru

LT — длина талона, LUF — длина верхней фасетки сочленовного мышелка, PE — длина до выемки заднего края (posterior emargination), PW — задняя ширина, TAW — ширина талонида, TRW — ширина тригонида, W — ширина. PE-индекс (индекс эмаргинации) определен по формуле  $(LL+BL)/2PE-1$  [4, 6].

Отряд Lipotyphla Haeckel, 1866

Семейство Soricidae Fischer von Waldheim, 1817

Подсемейство Crocidurinae Milne-Edwards, 1872

Род *Crocidura* Wagler, 1832

*Crocidura kornfeldi* Kormos, 1934

*Crocidura kornfeldi*: [14, с. 304, рис. 37].

Голотип — Геологический музей Венгрии, Будапешт, № Ob. 3686, фрагмент черепа с левыми  $I^1$ ,  $A^1$ ,  $A^3$ ,  $P^4$  и правыми  $I^1$ ,  $A^1$  и  $P^4-M^2$ ; южная Венгрия, местонахождение Виллань 3; нижний плейстоцен, средний виллафранк (MN17).

О п и с а н и е (рис. 1, 2). Ростральная часть черепа массивная (экз. ПИН, № 5644/201). Переднее отверстие подглазничного канала находится на уровне задней части  $M^1$ , заднее отверстие — на уровне середины  $M^2$ . Слезное отверстие мелкое, расположено на уровне парастилия  $M^2$ .

В верхней челюсти представлены крючковидный передний резец, три мелких одновершинных антемоляра и щечные зубы  $P^4-M^3$ . Вершина резца узкая, заостренная. Бугорок талона маленький, тупой. Постеролабиальный цингулюм узкий, но отчетливый, слегка волнистый.

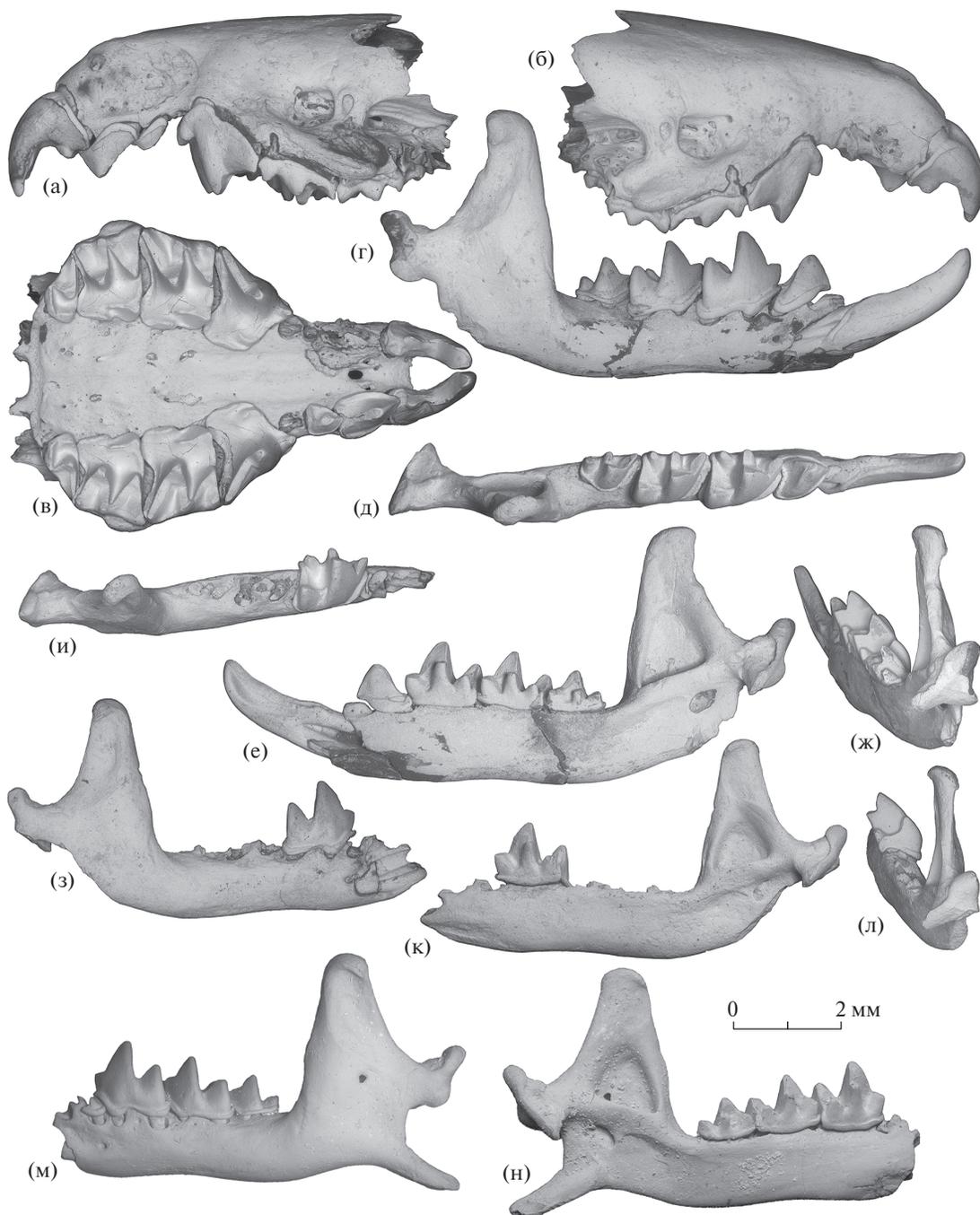
Верхние антемоляры однобугорковые, с отчетливо смещенными вперед массивными вершинами. Базальные цингулюмы хорошо развиты на задней и боковых сторонах, особенно на лабиальной.  $A^1$  — самый крупный из верхних антемоляров, по длине в 1.73 раза превышает  $A^2$ . С окклюзионной стороны  $A^1$  и  $A^2$  округло-треугольных очертаний,  $A^1$  более вытянутый, с вогнутым задним краем. На  $A^1$  и  $A^2$  от вершины к передней стороне основания коронки протягивается короткий толстый гребень; задний гребень столь же мощный, но более длинный.  $A^2$  слегка налегает на вогнутую заднюю часть  $A^1$ . Судя по размерам задней контактной площадки  $A^2$  и размерам альвеолы  $A^3$ , последний верхний антемоляр величиной превосходил  $A^2$ , но уступал  $A^1$ .

$P^4-M^2$  с хорошо выраженной, но сравнительно неглубокой выемкой заднего края (задней вырезкой, или эмаргинацией).  $P^4$  относительно высокий и длинный. На  $P^4$  парастиль низкий, сильно выступающий антеролабиально, отделен от паракона глубокой долиной. Гребень парастилия не развит, либо короткий и слабый. Паракон с мощным высоким гребнем паракристы. Малень-

кий гребневидный протокон расположен лабиальнее антеролингвального угла окклюзионной поверхности и отделен от выступа гипокона глубокой долиной. Выступ гипокона окаймлен мощным цингулоподобным гребнем, в передней части которого различимо слегка обособленное небольшое возвышение.

$M^1-M^2$  относительно длинные и широкие, с резким W-образным эктолофом. Паракон существенно меньше и ниже метакона, особенно на  $M^1$ . Протокон связан с лингвальным основанием паракона высоким гребнем, между протоконом и метаконном имеется широкая и глубокая долина. Плохо обособленный в пределах цингулюма мелкий гребневидный гипокон расположен постеролингвальнее протокона и отделен от него долиной. У  $M^1$  задняя сторона по ширине больше передней, антеролабиальный выступ слабый, с небольшим парастилем, постеролабиальный угол сильно выступает, метастиль прямой, гребневидный, выступ гипокона обширный, постцингулюм широкий, имеется узкий лингвальный цингулюм между протоконом и гипоконном. На  $M^2$  задняя выемка слабее, чем на  $M^1$ , передняя сторона существенно шире задней, парастиль удлиненный, слегка изогнутый, метастиль короткий и прямой, выступ гипокона относительно небольшой, постцингулюм узкий, лингвальный цингулюм нечеткий.  $M^3$  редуцированный, с относительно крупным параконном; протокон, гипокон и краевые поперечные гребни окаймляют лингвальный бассейн, открытый только на небольшом участке между лингвальными бугорками.

Горизонтальная ветвь нижнечелюстной кости низкая. Подбородочное отверстие расположено на уровне границы  $P_4/M_1$ , лежит в отчетливой бороздке. Симфиз достигает уровня задней части  $P_4$ . Нижнечелюстное отверстие мелкое. Венечный отросток массивный, длинный и относительно высокий, расширенный в средней части и узкий у вершины. Его передняя часть слегка наклонена дистально. Наружная височная ямка хорошо очерчена, простирается от области вершины венечного отростка до уровня немного вентральнее верхней сигмовидной вырезки. Спикула отсутствует или нечеткая, в виде слабого вентрального выступа утолщенной апикальной части венечного отростка. Внутренняя височная ямка округленно-треугольной формы, большая, простирается до середины высоты венечного отростка. Область ниже внутренней височной впадины углубленная, отделена от впадины сильно выступающим толстым гребнем. В нижней части верхней сигмовидной вырезки на дорсомедиальной поверхности основания сочленовного отростка хорошо заметна углубленная верхняя ямка крыловидного мускула. Мышелок сравнительно крупный с лабиальной стороны, выступает дале-

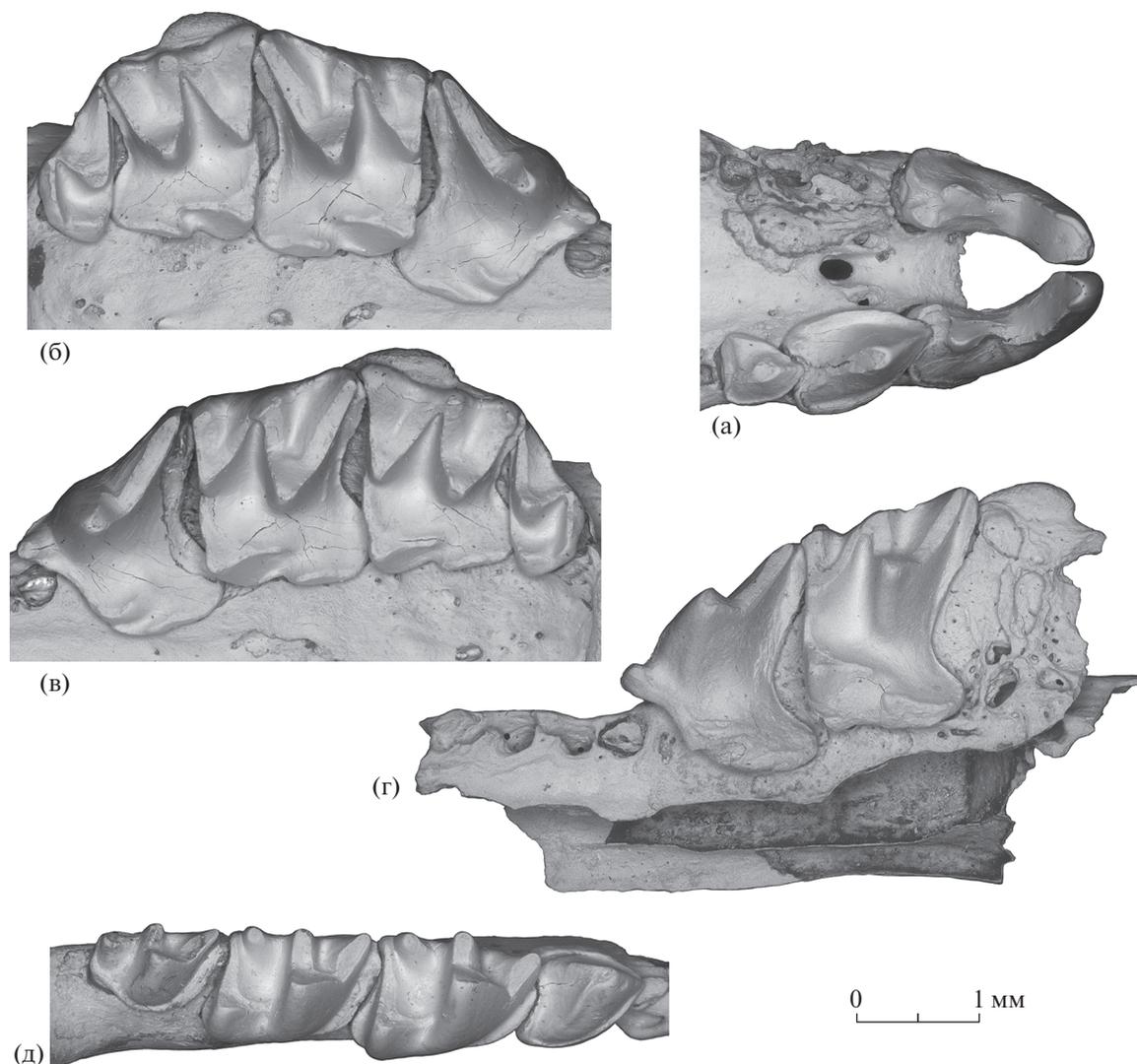


**Рис. 1.** *Crocidura kornfeldi* Kormos, 1934: а–в – экз. ПИН, № 5644/201, фрагмент черепа с левыми  $I^1-A^2$ ,  $P^4-M^3$  и правыми  $I^1$ ,  $P^4-M^3$ ; а – с левой латеральной стороны, б – с правой латеральной стороны, в – с вентральной стороны; г–ж – экз. ПИН, № 5644/204, правая нижнечелюстная кость с  $I_1$  и  $P_4-M_3$ : г – с лабиальной стороны, д – с окклюзиальной стороны, е – с лингвальной стороны, ж – с задней стороны; з–л – экз. ПИН, № 5644/206, правая нижнечелюстная кость с  $M_1$  и фрагментом корня  $I_1$ : з – с лабиальной стороны, и – с окклюзиальной стороны, к – с лингвальной стороны, л – с задней стороны; м, н – экз. ПИН, № 5644/211, левая нижнечелюстная кость с фрагментом  $P_4$  и  $M_1-M_3$ : м – с лабиальной стороны, н – с лингвальной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

ко назад. Дистальная сторона мышелка относительно невысокая, межсуставная область сравнительно небольшая. Верхняя и нижняя фасетки мышелка объединены в уплощенную структуру L-образной формы (с заметной выемкой на латеральной стороне). Угловой отросток прямой, с

широким основанием, сужается слабо, в заднем направлении достигает уровня края сочленовного отростка.

Нижний резец  $I_1$  почти прямой, без четких дополнительных зубцов на слегка волнистой режу-



**Рис. 2.** *Crocidura kornfeldi* Kozmos, 1934: а–в – экз. ПИН, № 5644/201, левые  $I^1-A^2$ ,  $P^4-M^3$  и правые  $I^1$ ,  $P^4-M^3$  с окклюзионной стороны; а – область резцов и антемоляров, б – правые  $P^4-M^3$ , в – левые  $P^4-M^3$ ; г – экз. ПИН, № 5644/203, фрагмент левой верхнечелюстной кости с  $P^4-M^1$  с окклюзионной стороны; д – экз. ПИН, № 5644/204, правые  $P_4-M_3$  с окклюзионной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

шей кромке. Вершина резца слегка вздернута, лабиальный цингулид узкий, но четкий, лингвального цингулида нет. Медиальный гребень узкий, но длинный, тянется от вершины резца к области соединения корня с коронкой. Задний край лабиальной стороны коронки резца находится на уровне передней части  $P_4$  ( $A_2$ ), задний край лингвальной стороны – перед альвеолой  $A_1$ .

$P_4$  характерной тетраэдрической формы, с заостренным передним концом и немного вогнутым задним краем, высокой конической вершиной, двумя ветвями V-образного постерокристида (лабиальная ветвь заметно длиннее лингвальной), коротким талонидом и мощно развитыми цингулидами.

На  $M_1-M_2$  талонид немного шире тригонид. Гребень энтокониды неполный. Лабиальный

цингулид узкий, но четкий, волнистый, с хорошо выраженной ундуляцией под протоконидом  $M_1$ . Лингвальный цингулид слабый, иногда едва различимый. Прецингулид более длинный и широкий на  $M_2$ , чем на  $M_1$ . Лабиальная входящая складка (гипофлексид)  $M_1-M_2$  открывается намного дорсальнее цингулида (особенно на  $M_1$ ).  $M_3$  маленький и узкий; его тригонид соответствует по строению  $M_1-M_2$ , а талонид редуцирован до единственного бугорка (гипоконид), окаймленного хорошо развитым цингулидом с лабиальной, задней и лингвальной сторон.

Размеры в мм. Экз. ПИН, № 5644/201:  $LI^1-M^3dex$  – 8.1;  $LI^1-M^3sin$  – 8.1;  $LP^4-M^3dex$  – 4.8;  $LP^4-M^3sin$  – 4.9;  $LM^1-M^3dex$  – 3.3;  $LM^1-M^3sin$  – 3.35;  $I^1dex$ : L – 1.8, LT – 0.8, H – 1.4;  $I^1sin$ : L – 1.9,

LT – 0.8, H – 1.3; A<sup>1</sup>sin: L – 1.3, W – 0.85; A<sup>2</sup>sin: L – 0.75, W – 0.6; P<sup>4</sup>dex: BL – 2.0, LL – 1.0, PE – 0.95, W – 1.55; P<sup>4</sup>sin: BL – 2.0, LL – 1.05, PE – 1.0, W – 1.6; M<sup>1</sup>dex: BL – 1.5, LL – 1.35, PE – 1.25, AW – 1.85, PW – 2.05, PE-индекс – 0.28; M<sup>1</sup>sin: BL – 1.55, LL – 1.4, PE – 1.2, AW – 1.75, PW – 1.95, PE-индекс – 0.23; M<sup>2</sup>dex: BL – 1.35, LL – 1.3, PE – 1.1, AW – 1.85, PW – 1.6, PE-индекс – 0.21; M<sup>2</sup>sin: BL – 1.4, LL – 1.35, PE – 1.1, AW – 1.9, PW – 1.5, PE-индекс – 0.25; M<sup>3</sup>dex: L – 0.65, W – 1.3; M<sup>3</sup>sin: L – 0.65, W – 1.3 (dex – правый, sin – левый).

Экз. ПИН, № 5644/210, I<sup>1</sup>: L – 1.81, LT – 0.73, H – 1.26.

Экз. ПИН, № 5644/202, I<sup>1</sup>: L – 1.65, LT – 0.85, H – 1.4.

Экз. ПИН, № 5644/203, P<sup>4</sup>: BL – 1.9, LL – 1.05, PE – 0.9, W – 1.55; M<sup>1</sup>: BL – 1.5, LL – 1.3, PE – 1.05, AW – 1.65, PW – 1.85, PE-индекс – 0.33.

Экз. ПИН, № 5644/204: длина нижнечелюстной кости от вершины I<sub>1</sub> до задней стороны мышелка – 11.2; LI<sub>1</sub>–M<sub>3</sub> – 7.4; LP<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 4.8; LM<sub>1</sub>–M<sub>3</sub> – 3.9; I<sub>1</sub>: L – 3.2; P<sub>4</sub>: L – 1.1, W – 0.9; M<sub>1</sub>: L – 1.55, TRW – 1.05, TAW – 1.1; M<sub>2</sub>: L – 1.45, TRW – 0.95, TAW – 1.0; M<sub>3</sub>: L – 1.2, TRW – 0.7, TAW – 0.5; высота горизонтальной ветви под M<sub>1</sub> – 1.25, под M<sub>2</sub> – 1.25; HC – 1.45; LUF – 0.6; LLF – 1.3.

Экз. ПИН, № 5644/206: M<sub>1</sub>: L – 1.5, TRW – 0.95, TAW – 1.0; высота горизонтальной ветви под M<sub>1</sub> – 1.2, под M<sub>2</sub> – 1.3; HC – 1.4; LUF – 0.55.

Экз. ПИН, № 5644/207: M<sub>1</sub>: L – 1.5, TRW – 0.9, TAW – 1.0; высота горизонтальной ветви под M<sub>1</sub> – 1.5.

Экз. ПИН, № 5644/208: M<sub>1</sub>: L – 1.45, TRW – 0.85, TAW – 0.95; высота горизонтальной ветви под M<sub>1</sub> – 1.5.

Экз. ПИН, № 5644/211: длина от подбородочного отверстия до верхней точки дуги перед угловым отростком – 5.09; высота венечного отростка от верхней точки дуги перед угловым отростком – 4.19; LM<sub>1</sub>–M<sub>3</sub> – 3.78; M<sub>1</sub>: L – 1.55, TRW – 0.97, TAW – 1.07; M<sub>2</sub>: L – 1.48, TRW – 0.92, TAW – 0.97; M<sub>3</sub>: L – 1.12, TRW – 0.68; высота горизонтальной ветви под M<sub>1</sub> – 1.31.

**Сравнение.** Отличается от *C. obtusa* Kretzoi, 1938 (ранний – средний плейстоцен Европы) отсутствием четкой спикеры венечного отростка нижнечелюстной кости, более низким и слабее отогнутым назад венечным отростком, более низким сочленовным мышелком и меньшей межустановленной областью, а также более дорсальным положением гипофлексиды на M<sub>1</sub>–M<sub>2</sub>, от *C. zorzii* Pasa, 1942 (плейстоцен Европы) – значительно более мелкими размерами [см. 15, 16].

**З а м е ч а н и я .** Моляры на фрагменте черепа *C. kornfeldi* из Тавриды, экз. ПИН, № 5644/201, отличаются пропорциями от типичных для современных и многих ископаемых представителей рода *Crocidura* вытянутых по ширине верхних коренных зубов – они более длинные и менее широкие, а также имеют более низкий PE-индекс. Однако при этом по форме, строению и размерам они четко соответствуют зубам на голотипе *C. kornfeldi* [2, табл. 1, фиг. 1; 14, рис. 37]. В то же время экз. ПИН, № 5644/203 по указанным параметрам M<sup>1</sup> близок к другим экземплярам *C. kornfeldi*, демонстрирующим более типичные для *Crocidura* пропорции верхних моляров [2, табл. 1, фиг. 3–6; 6, рис. 2а]. Среди диагностических признаков верхних щечных зубов *C. kornfeldi* указываются короткие и широкие P<sup>4</sup> и M<sup>1</sup>–M<sup>2</sup> [4, 14]. Вероятно, отличительным признаком этого вида может быть меньшая в среднем глубина выемки заднего края этих зубов. Значение изменчивости по данному признаку можно оценить лишь на массовых материалах. В строении нижней челюсти и нижних зубов различий между *C. kornfeldi* из Центральной Европы и Средиземноморья и белозубкой из Тавриды не отмечается.

Белозубка Корнфельда была мелкой землеройкой, ее масса тела оценивается в 8.5 г [17]. Присутствие белозубок в фаунистическом комплексе является одним из указаний на наличие открытых обстановок во времена существования тавридской фауны.

**Р а с п р о с т р а н е н и е .** Нижний плейстоцен Европы.

**М а т е р и а л .** Из пещеры Таврида (южный коридор), из привходовой части (левый борт, без детализации положения и глубины) фрагмент черепа с левыми I<sup>1</sup>–A<sup>2</sup>, P<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> и правыми I<sup>1</sup>, P<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> (экз. ПИН, № 5644/201); восемь экземпляров из точки “Логово гиен” [см. 9]: фрагмент роstralной части черепа с правым I<sup>1</sup> и альвеолами левых I<sup>1</sup>–P<sup>4</sup> и правых A<sup>1</sup>–P<sup>4</sup> (экз. ПИН, № 5644/210; шурф 3, глубина 200–300 см); изолированный левый I<sup>1</sup> (экз. ПИН, № 5644/202; шурф 2, глубина 20–30 см); фрагмент левой верхнечелюстной кости с P<sup>4</sup>–M<sup>1</sup> и альвеолами A<sup>1</sup>–A<sup>3</sup> и M<sup>2</sup> (экз. ПИН, № 5644/203; шурф 2, глубина 50–60 см); правая нижнечелюстная кость с I<sub>1</sub>, P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub>, альвеолой A<sub>1</sub> и восходящей ветвью (экз. ПИН, № 5644/204; шурф 2, глубина 50–60 см); правая нижнечелюстная кость с M<sub>1</sub>, фрагментом корня I<sub>1</sub>, альвеолами A<sub>1</sub>–P<sub>4</sub>, M<sub>2</sub>–M<sub>3</sub> и восходящей ветвью (экз. ПИН, № 5644/206; шурф 2, глубина 40–50 см); фрагмент левой нижнечелюстной кости с M<sub>1</sub> и альвеолами M<sub>2</sub> (экз. ПИН, № 5644/207; шурф 2, глубина 20–30 см); фрагмент левой нижнечелюстной кости с M<sub>1</sub> (экз. ПИН, № 5644/208; шурф 2, глубина 30–40 см); левая нижнечелюстная кость с

фрагментом P<sub>4</sub> и M<sub>1</sub>–M<sub>3</sub> (экз. ПИН, № 5644/211; шурф 3, глубина 200–300 см).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Д.О. Гимранову (Институт экологии растений и животных УрО РАН), А.В. Лаврову (ПИН) и Д.Б. Старцеву (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского) за сборы материалов в пещере Таврида в 2020 г., Р.А. Ракиотову (ПИН) – за помощь в подготовке фотографий на СЭМ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hutterer R.* Genus *Crocidura*. In: Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference. Eds Wilson D.E., Reeder D.M. 3rd ed. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 2005. V. 1. P. 224–255.
2. *Mittermeier R.A., Wilson D.E.* Handbook of the mammals of the World. V. 8. Insectivores, sloths, and colugos. Barcelona: Lynx ed., 2018. 710 p.
3. *Flynn L.J., Jacobs L.L., Kimura Y., et al.* Siwalik fossil Soricidae: a calibration point for the molecular phylogeny of *Suncus* // *Paludicola*. 2020. V. 12. № 4. P. 247–258.
4. *Reumer J.W.F.* Ruscinian and early Pleistocene Soricidae (Insectivora, Mammalia) from Tegelen (The Netherlands) and Hungary // *Scripta Geologica*. 1984. V. 73. P. 1–173.
5. *Butler P.M.* Fossil history of shrews in Africa. In: Evolution of shrews. Eds. Wójcik J.M., Wolsan M. Białowieża: Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, 1998. P. 121–132.
6. *Rofes J., Cuenca-Bescós G.* Evolutionary history and biogeography of the genus *Crocidura* (Mammalia, Soricidae) in Europe, with emphasis on *Crocidura kornfeldi* // *Mammalian Biology*. 2011. V. 76. № 1. P. 64–78.
7. *Топачевский В.А.* Грызуны таманского фаунистического комплекса Крыма. Киев: Наукова думка, 1973. 235 с.
8. *Тесаков А.С., Гайдаленок О.В., Соколов С.А., и др.* Тектоника плейстоценовых отложений северо-восточной части Таманского полуострова, Южное Приазовье // *Геотектоника*. 2019. № 5. С. 12–35.
9. *Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др.* Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // *Доклады Академии наук*. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
10. *Лопатин А.В.* *Hypolagus brachygnathus* (Lagomorpha, Leporidae) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида в Крыму // *Доклады Академии наук*. 2019. Т. 486. № 5. С. 643–646.
11. *Лопатин А.В.* Дикобраз *Hystrix (Acanthion) vinogradovi* (Rodentia, Hystriidae) из раннеплейстоценового местонахождения Таврида в Крыму // *Доклады Академии наук*. 2019. Т. 486. № 6. С. 756–762.
12. *Лопатин А.В.* Совместное присутствие *Hypolagus* и *Lepus* (Leporidae, Lagomorpha) в раннем плейстоцене Крыма // *Доклады Академии наук*. 2019. Т. 489. № 6. С. 651–653.
13. *Лопатин А.В.* Новые раннемиоценовые землеройки (Soricidae, Mammalia) Казахстана // *Палеонтологический журнал*. 2004. № 2. С. 93–101.
14. *Kormos T.* Neue Insektenfresser, Fledermäuse und Nager aus dem Oberpliozän der Villányer Gegend // *Földtani Közlöny*. 1934. V. 64. P. 296–321.
15. *Botka D., Mészáros L.* *Crocidura* (Mammalia, Soricidae) remains from the late Early Pleistocene Somssich Hill 2 locality (Villány Hills, Southern Hungary) // *Fragmenta Palaeontologica Hungarica*. 2015. V. 32. P. 67–98.
16. *Mészáros L., Botka D., Gasparik M.* Establishing a neotype for *Crocidura obtusa* Kretzoi, 1938 (Mammalia, Soricidae): an emended description of this Pleistocene white-toothed shrew species // *Paläontologische Zeitschrift*. 2020. V. 94. P. 367–375.
17. *Moncunill-Solé B., Jordana X., Köhler M.* How common is gigantism in insular fossil shrews? Examining the ‘Island Rule’ in soricids (Mammalia: Soricomorpha) from Mediterranean Islands using new body mass estimation models // *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2016. V. 178. № 1. P. 163–182.

## EARLY PLEISTOCENE WHITE-TOOTHED SHREW *CROCIDURA KORNFELDI* (LIPOTYPHILA, SORICIDAE) FROM CRIMEA

Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>a, #</sup> and A. S. Tesakov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Geological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: alopat@paleo.ru*

The remains of the white-toothed shrew *Crocidura kornfeldi* Kormos, 1934 (one skull fragment with almost complete dentition, the fragmental rostral part of a skull with the left upper incisor, a maxillary fragment, five mandibular fragments and an isolated upper incisor) from the Lower Pleistocene deposits of the Taurida cave in the central Crimea (Belogorsk district, Zuya village) are described. This earliest European species of the genus *Crocidura* was quite common in the Early Pleistocene of Central Europe and the Mediterranean; for the first time, it is described from Crimea and the entire Eastern Europe.

*Keywords:* *Crocidura kornfeldi*, Soricidae, Lipotyphla, shrews, Early Pleistocene, Taurida cave, Crimea

УДК 569.323:551.793(597)

## НОВЫЙ ВИД *TYPHLOMYS* (PLATACANTHOMYIDAE, RODENTIA) ИЗ СРЕДНЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА СЕВЕРНОГО ВЬЕТНАМА

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин\*

Поступило 25.06.2021 г.  
После доработки 16.07.2021 г.  
Принято к публикации 16.07.2021 г.

Из среднеплейстоценового пещерного местонахождения Там-Хай в северном Вьетнаме (провинция Лангшон) по фрагменту верхнечелюстной кости и изолированным зубам описан новый вид роющих сонь *Typhlomys stegodontis* sp. nov. Эта первая находка ископаемых Platacanthomyidae во Вьетнаме заполняет среднеплейстоценовый пробел в палеонтологической летописи семейства.

**Ключевые слова:** *Typhlomys*, роющие сонь, Platacanthomyidae, Myomorpha, Rodentia, средний плейстоцен, Вьетнам, Лангшон

**DOI:** 10.31857/S2686738921060093

В настоящее время на севере Вьетнама обитает весьма редкая роющая соня *Typhlomys chapensis* Osgood, 1932, представитель небольшого семейства колючих сонь (Platacanthomyidae) [1]. Этот мелкий мышеобразный грызун, живущий в тропических горных лесах, парадоксальным образом приспособлен к древолазанию и к рытью; при этом он почти слеп и ориентируется при передвижении с помощью ультразвуковой эхолокации, подобно рукокрылым [2]. Современный ареал вида ограничивается высокогорным районом Шапа в провинции Лаокай на севере Вьетнама [1, 3, 4] и прилегающей областью Южного Китая (= *T. cinereus jingdongensis* Wu et Wang, 1984; Юньнань, Цзиндун) [5–8]. Палеонтологическая история *Typhlomys* во Вьетнаме не изучена, тогда как в Китае остатки нескольких видов роющих сонь обнаружены в верхнем миоцене [9, 10], плиоплейстоцене [11], нижнем плейстоцене [12–16] и низах верхнего плейстоцена [17].

Ниже описаны ископаемые остатки *Typhlomys* из Вьетнама – фрагмент верхнечелюстной кости и изолированные зубы *T. stegodontis* sp. nov. из среднего плейстоцена пещеры Там-Хай, провинция Лангшон, уезд Биньзя (Binh Gia), собранные экспедиционным отрядом Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в марте 2021 г. в ходе работ Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (Тропический

центр, Ханой). Пещера Там-Хай (Thảm Hai, Tham Hai) входит в пещерный комплекс Там-Кхюиен (Thảm Khuê), известный совместными находками *Homo erectus* (Dubois, 1893) и *Gigantopithecus blacki* von Koenigswald, 1935 и датированный средним плейстоценом (Там-Хай: 300–200 тыс. лет, 250 тыс. лет; Там-Кхюиен:  $475 \pm 125$  тыс. лет) [см. 18–20]. В сборах 2021 г. из пещеры Там-Хай обильно представлены остатки мелких млекопитающих, включая насекомоядных (Erinaceidae, Soricidae), рукокрылых (в том числе Pteropodidae) и грызунов. Среди последних преобладают разнообразные Muridae, сравнительно многочисленны Hystricidae и Sciuridae, а наиболее редки Cricetidae (Arvicolinae) и Platacanthomyidae (*Typhlomys stegodontis* sp. nov.).

Описанный в статье материал хранится в коллекции ПИН, Москва. Терминология строения зубов по [9], с изменениями (см. рис. 1). Фотографии сделаны с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega 3 XMU в ПИН.

Отряд Rodentia Bowdich, 1821

Семейство Platacanthomyidae Alston, 1876

Род *Typhlomys* Milne-Edwards, 1877

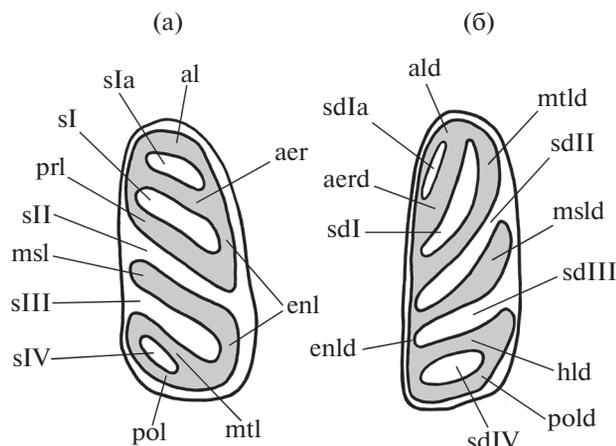
*Typhlomys stegodontis* Lopatin, sp. nov.

Название вида по совместному нахождению с вымершим родом хоботных *Stegodon*.

Голотип – ПИН, № 5826/501, фрагмент правой верхнечелюстной кости с  $M^1$ – $M^2$  (рис. 2); северный Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

Описание (рис. 2, 3). Задний край основания переднего корня скуловой дуги расположен

Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка  
Российской академии наук, Москва, Россия  
\*e-mail: alop@paleo.ru



**Рис. 1.** Терминология элементов строения моляров *Typhlomys* (по [9], с изменениями): а – правый  $M^1$ ; б – правый  $M^1$ . Обозначения: гребни: aer – передний дополнительный гребень (на верхних молярах); aerd – передний дополнительный гребень (на нижних молярах); al – антеролоф; ald – антеролофид; enl – эндолоф; enld – эндолофид; hld – задний дополнительный гребень (гиполофид); msl – мезолоф; msld – мезолофид; mtl – металоф; mtld – металофид; pol – постеролоф; pold – постеролофид; prl – протолоф; складки и долинок: sI – парафоссетта (синклин I); sIa – антерофоссетта (синклин Ia); sII – мезофоссетта (синклин II); sIII – метафоссетта (синклин III); sIV – постерофоссетта (синклин IV); sdI – мезофоссеттид (синклинид I); sdIa – антерофоссеттид (синклинид Ia); sdII – эктофоссеттид (синклинид II); sdIII – гипофоссеттид (синклинид III); sdIV – постерофоссеттид (синклинид IV).

на уровне передней части  $M^1$ . Моляры лофодонтные, с плоской или немного вогнутой жевательной поверхностью, состоящей из шести поперечных и диагональных гребней и пяти складок и долинок (на  $M_3$  – из пяти гребней и четырех долинок). Верхние моляры трехкорневые, нижние – двухкорневые.

Верхние моляры со слабо выраженной лингвальной гипсодонтией. На  $M^1$ – $M^2$  диагональные средние гребни (mid-ridges; передний дополнительный гребень, протолоф, мезолоф и металоф) и соответствующие долинок (парафоссетта, мезофоссетта и метафоссетта) ориентированы под углом около 45–60° к продольной оси зуба (рис. 2).

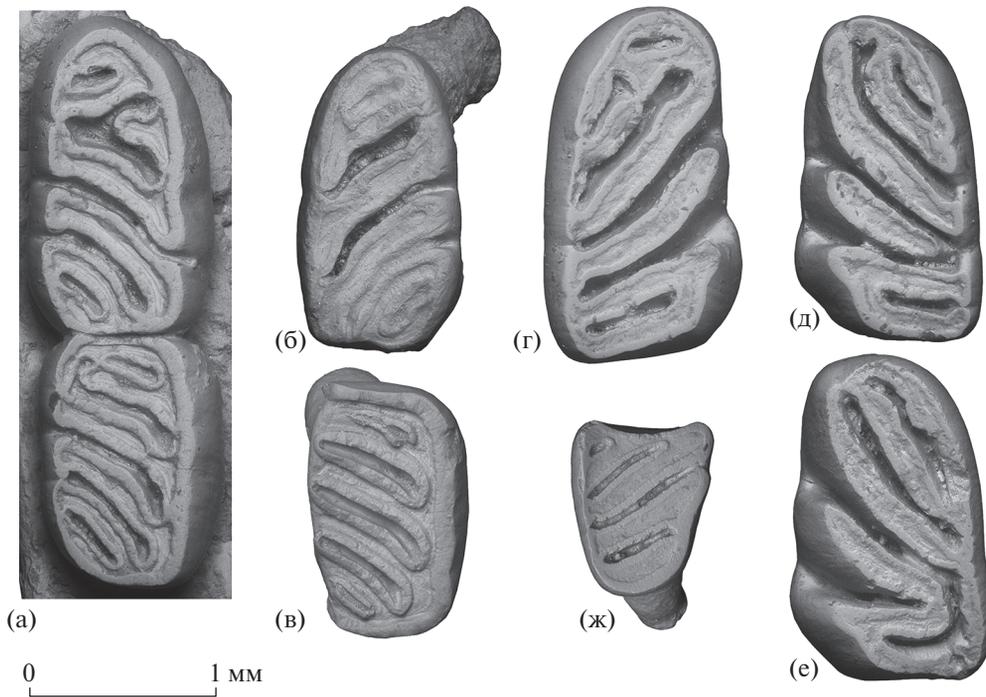
$M^1$  длинный и узкий, заметно сужающийся спереди (рис. 3а). Антеролоф короткий, сильно изогнут вперед. Передний дополнительный гребень (anterior extra ridge) полный, ограничивает сзади короткую и узкую замкнутую антерофоссетту (синклин Ia). Парафоссетта (синклин I) закрыта лабиально и лингвально, на голотипе раздвоенная – имеет антеролингвальное ответвление, достигающее эмалевой стенки зуба. Протолоф и мезолоф широкие, субпараллельные, в лингвальной части сближаются, но не сливаются.



**Рис. 2.** *Typhlomys stegodontis* sp. nov., голотип ПИН, № 5826/501, фрагмент правой верхнечелюстной кости с  $M^1$ – $M^2$  с окклюзиальной стороны; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

Мезофоссетта (синклин II) открыта лабиально и лингвально, оба устья узкие и неглубокие (рис. 3а). При сильном стирании мезофоссетта лингвально замкнута, образован непрерывный эндолоф (рис. 3б). Метафоссетта (синклин III) открыта лабиально, ее лингвальный конец касается эмалевой стенки зуба в постеролингвальном углу жевательной поверхности. Металоф и постеролоф короткие. Постерофоссетта (синклин IV) маленькая, закрытая.

$M^2$  субпрямоугольных очертаний, сужающийся сзади, по строению в целом близок  $M^1$ . Антеролоф длинный, прямой. Имеется относительно длинная антерофоссетта. На голотипе парафоссетта имеет небольшое переднее ответвление, примыкающее к антерофоссетте с лабиальной стороны. Все долинок закрыты лингвально, эндолоф полный. При слабом стирании мезофоссетта лабиально открытая, другие долинок замкнуты с лабиальной стороны, хотя соответствующие гребни не сращены. Таким образом, на ранней стадии стирания эктолоф не сформирован (рис. 3а), тогда как на более поздней – хорошо развит (рис. 3в).



**Рис. 3.** *Typhlomys stegodontis* sp. nov.: а – голотип ПИН, № 5826/501, правые  $M^1$ – $M^2$ ; б – экз. ПИН, № 5826/551, левый  $M^1$ ; в – экз. ПИН, № 5826/552, правый  $M^2$ ; г – экз. ПИН, № 5826/502, правый  $M^1$ ; д – экз. ПИН, № 5826/503, левый  $M^1$ ; е – экз. ПИН, № 5826/553, левый  $M^1$ ; ж – экз. ПИН, № 5826/554, правый  $M^3$ ; Вьетнам, провинция Лангшон, пещера Там-Хай; средний плейстоцен.

Судя по частично сохранившимся на голотипе альвеолам,  $M^3$  по длине существенно уступает  $M^2$  (рис. 2).

На  $M^1$  диагональные средние гребни (передний дополнительный гребень, металофид и мезолофид) и соответствующие долинки (мезофоссетид и эктофоссетид) ориентированы под углом около  $35^\circ$ – $55^\circ$  к продольной оси зуба, задний дополнительный гребень (гиполофид) и гипофоссетид – субпоперечные (около  $70^\circ$ – $85^\circ$ ).  $M^1$  удлинненный, узкий в передней части. Антеролофид плавно изогнут вперед. Передний дополнительный гребень отчетливый, диагонально ориентированный (сильно скошен постеролингвально), соединяется с антеролофидом и эндолофидом и замыкает длинный антерофоссетид (синклинид Ia), иногда разделенный надвое (рис. 3г). Металофид, соединяющий протоконид с метаконидом, является самым длинным из диагональных гребней. Вместе с передним дополнительным гребнем он обрамляет мезофоссетид (синклинид I). При слабом стирании (рис. 3д) дентиновые поля антеролофида и металофида в передней части жевательной поверхности разделены, а их эмалевые стенки соприкасаются, но не сливаются. В сочетании с небольшим углублением стенки зуба в области соединения указанных гребней это свидетельствует о первоначальном наличии узкого и мелкого антеролабиального выхода мезофоссет-

тида. С лингвальной стороны мезофоссетид открыт на ранней стадии стирания (рис. 3д), но замкнут на более поздних (рис. 3г, 3е). Эктофоссетид (синклинид II) открыт лабиально и лингвально либо упирается в эндолофид (рис. 3е). Мезолофид хорошо развит, имеет три варианта строения (морфотипа): (1) полный мезолофид, связывающий мезоконид с эндолофидом (рис. 3г); (2) свободный мезолофид, лингвально ограниченный слитыми долинками эктофоссеттида и гипофоссеттида (рис. 3д; см. сходное строение мезолофида  $M^1$  у позднемiocенового *T. primitivus* [9, табл. II, фиг. 11, 12, рис. 44a] и современного *T. cinereus* [13, рис. 1–7]); (3) укороченный мезолофид, в лингвальной части присоединенный к заднему дополнительному гребню (рис. 3е). Гипофоссетид (синклинид III) открыт лабиально, но замкнут лингвально (или имеет общий выход с эктофоссеттидом, см. рис. 3д). Задний дополнительный гребень (posterior extra ridge) соединяет гипоконид с энтоконидом (рис. 3г, 3д) или мезолофидом (рис. 3е). Постеролофид длинный, субпоперечный, параллельный заднему дополнительному гребню. Постерофоссетид (синклинид IV) широкий, замкнутый (однако при слабом стирании постеролофид и гиполофид лингвально не слиты, см. рис. 3д), в антеролингвальной части иногда связан с эктофоссеттидом (рис. 3е).

$M_3$  субтреугольный, короткий, сужающийся сзади (рис. 3ж). Антерофоссетид очень маленький, антеролингвальный по положению. Передний дополнительный гребень, металофид, мезолофид и постеролофид широкие, ориентированы диагонально. Мезофоссетид протяженный, замкнутый. Эктофоссетид открыт лабиально, а в своей лингвальной части достигает эндолофида. Гипофоссетид закрытый, касается лингвальной и лабиальной эмалевых стенок зуба. Задний дополнительный гребень и постерофоссетид отсутствуют.

Размеры в мм. Длина  $M^1$ – $M^2$ : 3.25 (голотип).

Размеры зубов (L – длина, W – ширина, EH – лабиальная высота коронки, IH – лингвальная высота коронки):  $M^1$ : L – 1.8, W – 1.1, EH – 0.55, IH – 0.75 (голотип); L – 1.7, W – 0.95, EH – 0.5, IH – 0.7 (экз. ПИН, № 5826/551);  $M^2$ : L – 1.4, W – 1.1, EH – 0.5, IH – 0.7 (голотип); L – 1.4, W – 0.9, EH – 0.45, IH – 0.6 (экз. ПИН, № 5826/552);  $M_1$ : L – 1.95, W – 1.15, EH – 0.75, IH – 0.75 (экз. ПИН, № 5826/502); L – 1.9, W – 1.1, EH – 0.9, IH – 0.8 (экз. ПИН, № 5826/553); L – 1.8, W – 1.05, EH – 0.8, IH – 0.8 (экз. ПИН, № 5826/503);  $M_3$ : L – 1.0, W – 0.8, EH – 0.3, IH – 0.4 (экз. ПИН, № 5826/554).

С р а в н е н и е . По размерам зубов новый вид существенно мельче позднемиоценового *T. storchi* Qiu et Ni, 2019 и раннеплейстоценового *T. macrourus* Zheng, 1993, меньше позднемиоценового *T. hipparionum* Qiu, 1989, но крупнее *T. primitivus* Qiu, 1989 (поздний миоцен), *T. intermedius* Zheng, 1993, *T. anhuiensis* Jin et al., 2009 (ранний плейстоцен), современных *T. nanus* Cheng et al., 2017, *T. cinereus* Milne-Edwards, 1877, *T. chapensis* Osgood, 1932, *T. daloushanensis* Wang et Li, 1996 и *T. huangshanensis* Hu et Zhang in Hu et al., 2021 (*T. chapensis* из Вьетнама и Южного Китая, остальные виды из Китая). От всех перечисленных видов *T. stegodontis* sp. nov. отличается наличием морфотипа  $M^1$  с раздвоенной парафоссеттой и морфотипа  $M_1$  с лингвальным соединением мезолофида с задним дополнительным гребнем. Кроме того, новый вид отличается от *T. primitivus* относительно более широким в передней части  $M_1$ ; от *T. hipparionum* – относительно менее удлинёнными  $M_1$  и  $M_3$ ; от *T. storchi* – менее вытянутым в длину  $M_1$  с открытыми эктофоссеттидом и гипофоссеттидом; от *T. macrourus* – более низкоронковыми и менее удлинёнными молярами, относительно более узким в передней части  $M^1$  и наличием антерофоссетты на  $M^2$ ; от *T. intermedius* – лабиально открытыми мезофоссеттой и метафоссеттой  $M^1$ ; от *T. anhuiensis* – сильнее редуцированным  $M_3$ ; от *T. chapensis* – наличием антерофоссетты на  $M^2$  и лабиально закрытым мезофоссеттидом  $M_1$ ; от *T. cinereus* – относительно более узким в передней

части  $M^1$  и наличием антерофоссетты на  $M^2$ ; от *T. daloushanensis* – относительно более узкими  $M^1$ – $M^2$  и сильнее вытянутым  $M^2$ ; от *T. nanus* – наличием антерофоссетты на  $M^2$  и постерофоссеттида на  $M_1$ , а также закрытым мезофоссеттидом  $M_1$ ; от *T. huangshanensis* – более узкими  $M^1$ – $M^2$  и наличием антерофоссетты на  $M^2$ .

З а м е ч а н и я . Большинство ископаемых роющих сонь известно преимущественно по изолированным зубам, поэтому сравнение зубных размеров *T. stegodontis* sp. nov. с вымершими видами *Typhlomys* проведено по верхним и нижним молярам соответствующих локусов (данные по [9–16]). В случае современных видов *Typhlomys* сравнимым параметром является длина ряда верхних моляров [см. 6–8]. Сохранность голотипа *T. stegodontis* sp. nov. позволяет провести его сравнение с современными видами по длине  $M^1$ – $M^3$ . Расстояние от переднего конца коронки  $M^1$  до заднего края сохранившегося фрагмента верхнечелюстной кости, обломанной приблизительно на уровне середины альвеолы заднего лабиального корня  $M^3$  (см. рис. 2), составляет 4.0 мм. С учетом предполагаемых размеров отсутствующего  $M^3$  аппроксимированная длина ряда верхних моляров голотипа *T. stegodontis* sp. nov. достигает приблизительно 4.2–4.3 мм, что превосходит средние значения длины  $M^1$ – $M^3$  всех современных видов и находится вблизи верхней границы пределов изменчивости этого параметра у самых крупных из них (минимум – среднее – максимум: *T. nanus*: 3.13–3.31–3.49 мм, 3 экз. [7]; *T. cinereus*: 3.2–3.3–3.4 мм, 2 экз. [7]; 3.4–3.46–3.62 мм, 4 экз., самки; 3.39–3.74–3.86 мм, 4 экз., самцы [1]; 3.4–3.6–3.7 мм, 6 экз. [6]; *T. chapensis*: 3.46–3.61–3.85 мм, 21 экз. [7]; 3.55–3.85–4.09 мм, 11 экз., самки; 3.57–3.96–4.14 мм, 4 экз., самцы [1]; 3.9–4.0–4.2 мм, 9 экз. [6]; *T. huangshanensis*: 3.56–3.74–4.05 мм, 9 экз. [8]; *T. daloushanensis*: 3.57–3.81–4.05 мм, 29 экз. [7]; 3.7–3.9–4.2 мм, 49 экз. [6]).

М а т е р и а л . Помимо голотипа, из местонахождения Там-Хай шесть изолированных зубов:  $M^1$  (экз. ПИН, № 5826/551),  $M^2$  (экз. ПИН, № 5826/552), три  $M_1$  (экз. ПИН, №№ 5826/502, 503, 553) и  $M_3$  (экз. ПИН, № 5826/554). Голотип и экз. ПИН, №№ 5826/502, 503 происходят из основного костеносного слоя красно-бурых алевролитов верхней галереи пещеры (21°55′51.7″ с.ш., 106°25′3.6″ в.д.); экз. ПИН, №№ 5826/551–554 – из обособленной северной галереи (21°55′52.5″ с.ш., 106°25′4.1″ в.д.).

Стегодонтовая роющая соня *Typhlomys stegodontis* sp. nov. из пещеры Там-Хай – первая находка ископаемых Platanthomyidae во Вьетнаме. Биохронологически она заполняет среднеплейстоценовый пробел в известной палеонтологической летописи семейства.

Анализ палеонтологических данных позволяет сделать некоторые наблюдения относительно эволюционной истории *Typhlomys*. Уже в позднем миоцене этот род был представлен тремя филогенетическими ветвями, к одной из которых принадлежит мелкий *T. primitivus*, ко второй — более крупный *T. hipparionum*, а к третьей — уклоняющийся по строению  $M_1$  и относительно очень крупный *T. storchi* [9, 10]. В раннем плейстоцене первая линия включала *T. intermedius* и *T. anhuiensis* [12–16], и именно с этой группой видов связывается среднеплейстоценовый *T. stegodontis* sp. nov., а также рецентный *T. cinereus* и все прочие современные виды, недавно выделенные из его состава при поддержке молекулярно-генетических данных [см. 1, 7, 8]. Вторая линия оборвалась в раннем плейстоцене на стадии *T. macrourus*, обладавшего относительно высокими коронками моляров [13]. Третья ветвь, видимо, не имела потомков. Следует отметить, что симпатрические ископаемые виды (*T. primitivus*, *T. hipparionum* и *T. storchi* в позднем миоцене, *T. intermedius* и *T. macrourus* в раннем плейстоцене) существенно отличались друг от друга по величине.

С учетом новых данных о современном разнообразии *Typhlomys* [1, 7, 8] видовая принадлежность сравнительно крупного представителя этого рода из раннеплейстоценового пещерного местонахождения Лунгудун (Longgudong) в провинции Хубэй Китая, отнесенного к ныне живущему виду *T. cinereus* [14, рис. 5.27, A–F], подлежит пересмотру. Указанная раннеплейстоценовая форма отличается от *T. cinereus* более крупными размерами зубов [14, табл. 5.35], относительно более узким в передней части  $M^1$  и наличием антерофоссетты на  $M^2$ . Этими признаками, а также общим строением  $M_1$  и  $M_3$ , данная форма сближается с *T. stegodontis* sp. nov.; при этом она отличается от нового вида строением мезофоссетты  $M^2$ , закрытой лабиально, но открытой лингвально (у стегодонтовой роющей сони мезофоссетта  $M^2$ , напротив, открыта лабиально и закрыта лингвально). Вывод о видовой принадлежности раннеплейстоценовой хубэйской формы может быть сделан по итогам специального изучения морфотипической изменчивости массовых зубных остатков из пещеры Лунгудун [см. 14]; пока ее следует рассматривать как *Typhlomys* sp.

В верхнем плейстоцене идентифицирован только *Typhlomys cinereus* из Южного Китая [17]. При этом в настоящее время считается, что современное довольно высокое видовое разнообразие роющих сонь (не менее пяти аллопатрических видов) на территории юго-восточного Китая и северного Вьетнама является результатом таксономической диверсификации в условиях изолированных горных областей [1, 6]. Открытие *T. stegodontis* sp. nov. в плейстоцене северного Вьетнама и

современное видовое разнообразие рода позволяют предполагать существование нескольких средне- и позднеплейстоценовых видовых линий *Typhlomys*. Современный ареал *T. chapensis* (горы Хоангльеншон на юге Китая и северо-западе Вьетнама) и среднеплейстоценовая область обитания *T. stegodontis* sp. nov. (северо-восточный Вьетнам) разделены долиной Красной реки (Хонгха), которая в плейстоцене могла быть одной из главных преград для распространения мелких млекопитающих в данном регионе.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен Е.Н. Машенко, Н.В. Волковой, А.В. Подлеснову, Б.И. Морковину (ПИН) и Ле Суан Даку (Le Xuan Das, Институт тропической экологии Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра, Ханой, Вьетнам) за участие в сборах материалов в 2021 г., А.Н. Кузнецову и С.П. Кузнецовой (Тропический центр) — за помощь в организации экспедиции, Р.А. Ракитову (ПИН) — за помощь в подготовке фотографий на СЭМ.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках работ Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (проект “Состав фауны приматов (Cercopithecidae, Pongidae) и грызунов (Rodentia) плейстоцена и голоцена Вьетнама как индикатор изменения экологических условий”).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramov A.V., Balakirev A.E., Rozhnov V.V. An enigmatic pygmy dormouse: molecular and morphological evidence for the species taxonomic status of *Typhlomys chapensis* (Rodentia: Platacanthomyidae) // Zoological Studies. 2014. V. 53. Art. № 34. P. 1–9.
2. Panyutina A.A., Kuznetsov A.N., Volodin I.A., et al. A blind climber: the first evidence of ultrasonic echolocation in arboreal mammals // Integrative Zoology. 2017. V. 12. № 2. P. 172–184.
3. Osgood W.H. Mammals of the Kelley-Roosevelts and Delacour Asiatic expeditions // Field Museum of Natural History. Zoological Series. 1932. V. 18. № 10. P. 193–339.
4. Кузнецов Г.В. Млекопитающие Вьетнама. М.: Т-во научных изданий КМК, 2006.
5. Wu D., Wang G. A new subspecies of *Typhlomys cinereus* Milne-Edwards from Yunnan, China // Acta Theriologica Sinica. 1984. V. 4. № 3. P. 213–215.
6. Wang Y., Li C., Chen Z. Taxonomy, distribution and differentiation on *Typhlomys cinereus* (Platacanthomyidae, Mammalia) // Acta Theriologica Sinica. 1996. V. 16. № 1. C. 54–66.

7. Cheng F., He K., Chen Z.-Z., et al. Phylogeny and systematic revision of the genus *Typhlomys* (Rodentia, Platacanthomyidae), with description of a new species // Journal of Mammalogy. 2017. V. 98. № 3. P. 731–743.
8. Hu T.-L., Cheng F., Xu Z., et al. Molecular and morphological evidence for a new species of the genus *Typhlomys* (Rodentia: Platacanthomyidae) // Zoological Research. 2021. V. 42. № 1. P. 100–107.
9. Qiu Z. Fossil platacanthomyids from the hominoid locality of Lufeng, Yunnan // Vertebrata Palasiatica. 1989. V. 27. № 4. P. 268–283.
10. Qiu Z., Ni X. Platacanthomyids (Rodentia, Mammalia) from the Late Miocene Yuanmou hominoid locality of Yunnan, China // Fossil Imprint. 2019. V. 75. № 3–4. P. 383–396.
11. Qiu Z.D., Jin C.Z. Platacanthomyid remains from the late Cenozoic deposits of East China // Vertebrata Palasiatica. 2017. V. 55. № 4. P. 315–330.
12. Zheng S. Quaternary rodents of Sichuan-Guizhou area, China. Beijing: Science Press; 1993.
13. Fejfar O., Kalthoff D.C. Aberrant cricetids (platacanthomyines, Rodentia, Mammalia) from the Miocene of Eurasia // Berliner geowissenschaftliche Abhandlungen. Ser. E. 1999. V. 30. P. 191–206.
14. Zheng S. Rodentia. In: Zheng S., ed. Jianshi hominid site. Beijing: Science Press; 2004. pp. 121–181, 387–394.
15. Jin C.Z., Zhang Y.Q., Wei G.B., et al. Rodentia Bowdich, 1821. In: Jin C., Liu J., eds. Paleolithic site – the Renzidong Cave, Fanchang, Anhui Province. Beijing: Science Press; 2009. P. 166–220, 401–412.
16. Wang Y., Jin C., Mead J.I. New remains of *Sinomastodon yangziensis* (Proboscidea, Gomphotheriidae) from Sanhe karst Cave, with discussion on the evolution of Pleistocene *Sinomastodon* in South China // Quaternary International. 2014. V. 339–340. P. 90–96.
17. Wei G., Huang W., Boëda E., et al. Recent discovery of a unique Paleolithic industry from the Yumidong Cave site in the Three Gorges region of Yangtze River, southwest China // Quaternary International. 2017. V. 434. Pt A. P. 107–120.
18. Olsen J.W., Ciochon R.L. A review of evidence for postulated Middle Pleistocene occupations in Viet Nam // Journal of Human Evolution. 1990. V. 19. P. 761–788.
19. Ciochon R., Vu The Long, Larick R., et al. Dated co-occurrence of *Homo erectus* and *Gigantopithecus* from Tham Khuyen Cave, Vietnam // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996. V. 93. № 7. P. 3016–3020.
20. Zeitoun V., Chinnawut W., Debryne R., et al. A sustainable review of the Middle Pleistocene benchmark sites including the *Ailuropoda*–*Stegodon* faunal complex: the Proboscidean point of view // Quaternary International. 2016. V. 416. P. 12–26.

## A NEW SPECIES OF *TYPHLOMYS* (PLATACANTHOMYIDAE, RODENTIA) FROM THE MIDDLE PLEISTOCENE OF NORTHERN VIETNAM

Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>#</sup>

*Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: alop@paleo.ru*

A pygmy dormouse *Typhlomys stegodontis* sp. nov. is described on the base of the maxillary fragment and isolated teeth from the Middle Pleistocene Tham Hai cave locality in northern Vietnam (Lang Son Province). This first finding of the fossil Platacanthomyidae in Vietnam fills the Middle Pleistocene gap in the paleontological record of the family.

**Keywords:** *Typhlomys*, pygmy dormouse, Platacanthomyidae, Myomorpha, Rodentia, Middle Pleistocene, Vietnam, Lang Son

УДК 569.742.7:551.793(477.75)

## РАННЕПЛЕЙСТОЦЕНОВАЯ РЫСЬ *LYNX ISSIODORENSIS* (FELIDAE, CARNIVORA) ИЗ ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА, КРЫМ

© 2021 г. А. В. Лавров<sup>1</sup>, Д. О. Гимранов<sup>2,\*</sup>, Б. А. Вахрушев<sup>3</sup>, академик РАН А. В. Лопатин<sup>1</sup>

Поступило 18.05.2021 г.  
После доработки 16.07.2021 г.  
Принято к публикации 16.07.2021 г.

Из раннеплейстоценового местонахождения пещера Таврида (Крым, поздний виллафранк, возраст 1.8–1.5 млн. лет) описаны краниальные и нижнечелюстные остатки двух взрослых особей *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828). Этот вид рысей был типичным представителем виллафранкской фауны Восточного Средиземноморья. Отмечена высокая краниологическая изменчивость *L. issiodorensis*.

**Ключевые слова:** *Lynx issiodorensis*, поздний виллафранк, пещера Таврида, Крым, премоляры, нижний моляр, сагиттальный гребень, внутривидовая изменчивость

**DOI:** 10.31857/S2686738921060081

Пещера Таврида была открыта в 2018 г. Она расположена на северном макросклоне Крымских гор, в междуречье рек Бештерек и Фундуклы (притоки р. Зуи, бассейн р. Салгир). В южном коридоре пещеры было обнаружено большое число ископаемых костей наземных позвоночных. Этот комплекс соответствует поздневиллафранкским фаунам Европы (зоны MNQ18–MNQ19) и псепкупскому фаунистическому комплексу России. Время существования ассоциации определено в интервале 1.8–1.5 млн. л.н. [1, 2]. В поздневиллафранкское время пещера через горизонтальный южный коридор открывалась в склоне долины р. Зуя и использовалась хищниками как логово [3–5].

В ходе раскопок 2020 г. в южном коридоре пещеры в 150 м от входа были найдены остатки двух особей исуарской рыси *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828): мозговая часть черепа с фрагментом левой глазницы сравнительно молодой особи (экз. ПИН, № 5644/90; рис. 1) и почти полная нижняя челюсть (без резцов и клыков) старой особи (экз. ПИН, № 5644/89; рис. 2). Кроме того, там же и в 100 м от выхода были найдены фраг-

менты трех лопаток, две плечевые кости, две локтевые кости, фрагменты пяти ребер, семи позвонков, две полные большие берцовые кости и другие фрагменты не менее чем еще от пяти взрослых особей.

Описанные в статье материалы хранятся в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН), Москва. Принятые сокращения: Нвс – высота мозговой коробки; Лро – посторбитальная длина черепа; Wbc – максимальная ширина мозговой коробки; Wpo – ширина заглазничного перехвата; L – длина; W – ширина; Ld – длина диастемы; La–p3 – длина нижней челюсти от заднего края сочленовного отростка до переднего края p3; dex – правый; sin – левый; n – число экземпляров; ЗММУ – Зоологический музей Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; APL – коллекция из местонахождения Апполония-1, Университет имени Аристотеля в Салониках, Греция; ING – коллекция из местонахождения Ингарано (Апулия), Зоологический музей, Рим, Италия; MHNВ Prr – коллекция из местонахождения Перье, Музей естественной истории, Базель, Швейцария; MHNЛ QSV – коллекция из местонахождения Сен-Валье, Музей естественной истории, Лион, Франция; SBAU – Управление архивами археологии Умбрии, Италия; ТВ – коллекция из местонахождения Туркобуния, Афинский университет, Греция.

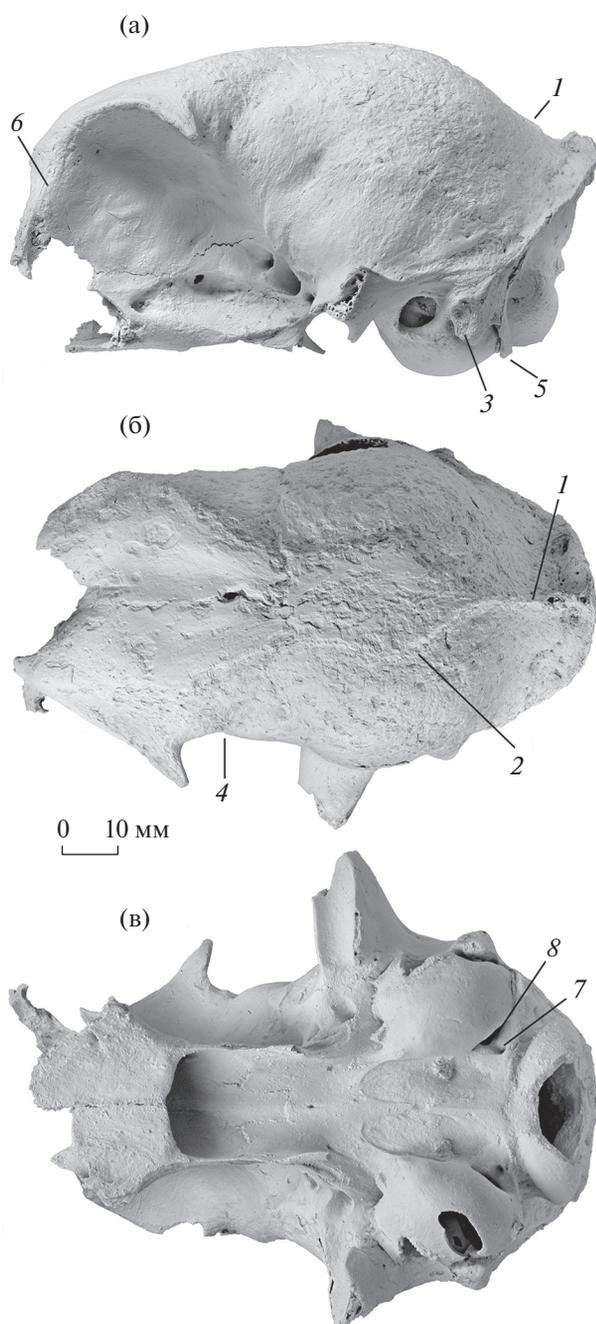
Сохранившаяся часть черепа (экз. ПИН, № 5644/90) включает мозговую коробку и большую часть левой глазницы (рис. 1). Поверхность кости умеренно эродирована. Череп принадле-

<sup>1</sup> Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

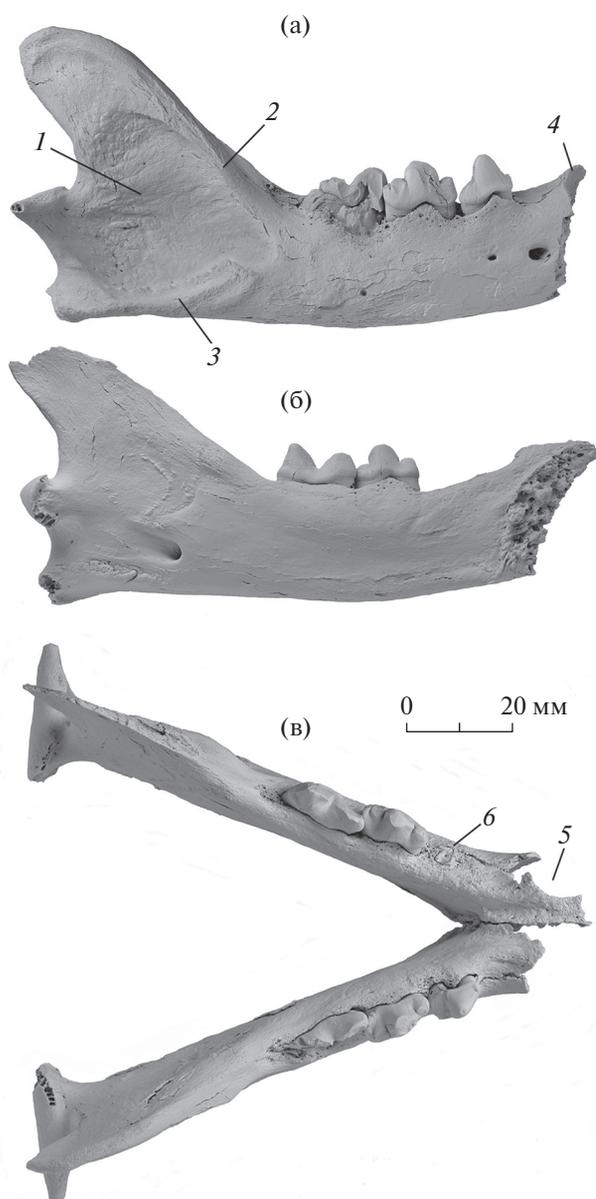
<sup>3</sup> Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

\*e-mail: djulfa250@rambler.ru



**Рис. 1.** *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828), экз. ПИН, № 5644/90, мозговая часть черепа с фрагментом левой глазницы: а – с левой латеральной стороны; б – с дорсальной стороны; в – с вентральной стороны; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: 1 – сагиттальный гребень; 2 – левый теменной гребень; 3 – сосцевидный отросток; 4 – положение заглазничного перехвата; 5 – околозатылочный отросток; 6 – передний край глазницы; 7 – подъязычное отверстие; 8 – заднее рваное отверстие.

жал сравнительно мелкой особи. По форме мозговая коробка сходна с экз. МННВ Prr 200 *L. issiodorensis* из местонахождения Этуэр, ранний виллафранк Франции [6]. У экз. ПИН, № 5644/90



**Рис. 2.** *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828), экз. ПИН, № 5644/89, парные ветви нижней челюсти: а – экз. ПИН, № 5644/89а, правая нижнечелюстная кость с р3–m1 с лабиальной стороны; б – экз. ПИН, № 5644/89б, левая нижнечелюстная кость с р4–m1 с лингвальной стороны; в – левые и правая ветви нижней челюсти в анатомическом сочленении с окклюзионной стороны; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: 1 – массетерная ямка; 2 – массетерный гребень; 3 – площадка для крепления средней порции массетера (*m. masseter medialis*); 4 – положение постеролингвального края альвеолы правого c1; 5 – край альвеолы левого c1; 6 – задний корень разрушенного при жизни левого р3 (альвеола переднего корня оссифицирована).

высота нейрокраниума по дорсовентральной оси больше, чем у экз. МННЛ QSV 1133 из Сен-Валье, поздний плиоцен Франции [7]. Экз. SBAU 337653 *L. issiodorensis valdarnensis* Werdelin, 1981 из Пантал-

**Таблица 1.** Размеры нейрокраниума современной *Lynx lynx* (Linnaeus, 1758) и *L. issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828) из нижнего плейстоцена Перуджи (Италия) и Крыма

Параметр	<i>L. lynx</i> , ЗММУ, <i>n</i> = 24, min–max	<i>L. issiodorensis</i>	
		Перуджа, экз. SBAU 337653 [8]	Крым, экз. ПИН, № 5644/90
1 Максимальная ширина мозговой коробки (Wbc)	54.8–64.5	62.3	58.8
2 Длина от носо-лобного шва до края затылочного гребня	94.9–118.2	105.3 <sup>1</sup>	88.7
3 Ширина заглазничного перехвата (Wpo)	35.2–44.1	43.6	44.8
4 Ширина в сосцевидных отростках	58.1–71.8	58.3	58.9
5 Высота мозговой коробки (от уровня основной затылочной кости до верхней точки теменной кости, Hbc)	46.3–55.6	50.7 <sup>1</sup>	53.9
6 Высота мозговой коробки от верхней точки теменной кости до вентрального края слухового барабана	57.1–69.2	56.9 <sup>1</sup>	49.8
7 Длина от заглазничного перехвата до заднего края затылочного гребня (заглазничная длина черепа, Lpo)	65.9–78.6	71.4	78.1
8 Отношение высоты мозговой коробки к заглазничной длине черепа (Hbc/Lpo)	0.644–0.749, <i>n</i> = 22; среднее = 0.678	0.797	0.637
9 Отношение ширины заглазничного перехвата к ширине мозговой коробки (Wpo/Wbc)	0.631–0.728 <i>n</i> = 22; среднее = 0.693	0.699	0.762

<sup>1</sup> Вычислено по фотографии из [8].

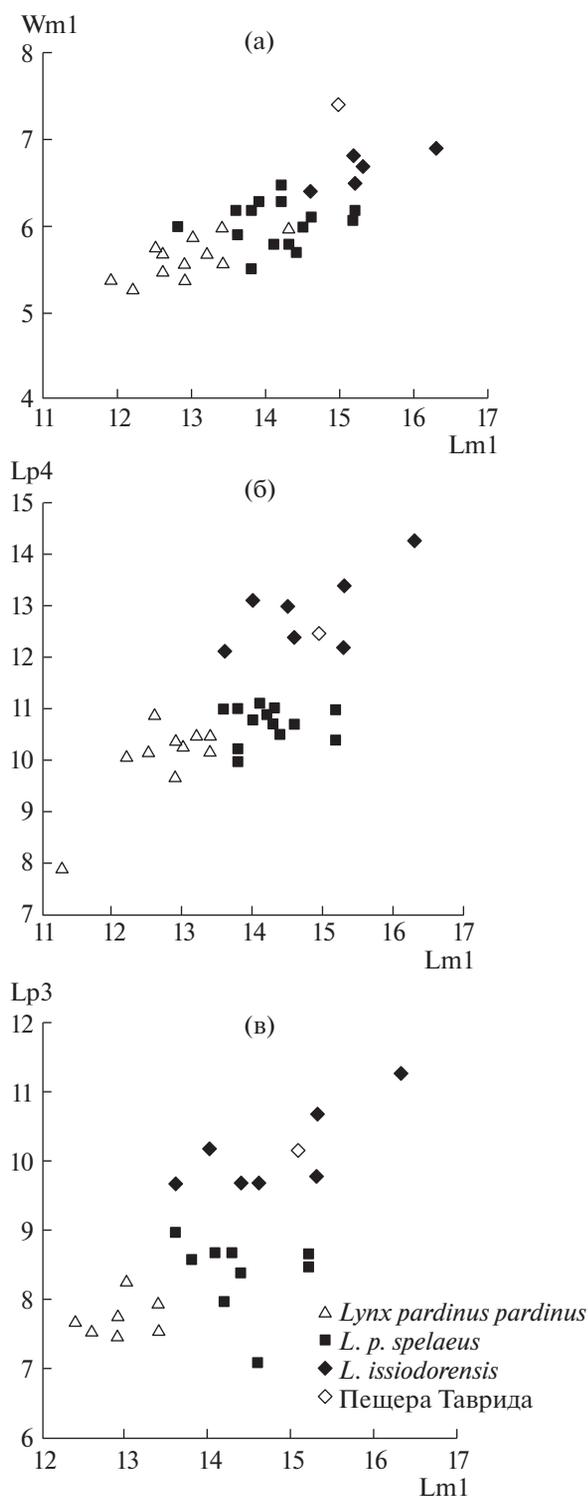
лы (поздний виллафранк Италии, Перуджа) резко отличается от экз. ПИН, № 5644/90 уплощенной формой мозговой коробки [8].

Сагиттальный гребень развит на черепах *L. issiodorensis* из Сен-Валье (экз. MNHL QSV 1133), Панталлы (экз. SBAU 337653) и Перье (экз. MNHB Prg 200), также как у многих экземпляров современной обыкновенной рыси *L. lynx* (Linnaeus, 1758). Этот гребень у *Lynx* очень низкий – на большей части протяжения его высота 1–2 мм. Сагиттальный гребень на черепе из пещеры Таврида развит только в задней части свода черепа – его длина всего 15 мм. Теменные гребни находятся в 13–17 см друг от друга (рис. 1б). Форма лирообразной фигуры, образованной этими гребнями, соответствует типу С, выделенному для *L. pardinus* (Temminck, 1827) [9]. У современной *L. lynx* степень развития сагиттального гребня очень изменчива (*n* = 104, ЗММУ): у 36.7% экземпляров он хорошо выражен, у 38.3% случаев он не развит, и положение теменных гребней близко к таковому у экз. ПИН, № 5644/90 (рис. 1). В 25% случаев состояние теменных гребней близко к слиянию: расстояние между ними составляет 3–4 мм, но сагиттальный гребень не сформирован. Передний край мозговой коробки широкий, что типично для *Lynx*. Отношение высоты мозговой коробки к заглазничной длине черепа (Hbc/Lpo) у

образца из Крыма близко к значениям у *L. lynx* (табл. 1).

Форма и размер слухового барабана у экз. ПИН, № 5644/90 как у современной *L. lynx*: он удлиненный и выпуклый (рис. 1в), в отличие от округлого слухового барабана у экз. SBAU 337653 из Перуджи. Заглазничный перехват выражен слабо – отношение ширины заглазничного сужения к ширине мозговой коробки (индекс Wpo/Wbc) у *Lynx* больше, чем у *Puma* и многих других родов Felinae. Значение этого индекса у современных и ископаемых видов *Lynx* имеет невысокую изменчивость (табл. 1). На черепе экз. ПИН, № 5644/90 отверстие подъязычного нерва (for. hypoglossum) и заднее рваное отверстие (for. lacerum posterius) расположены близко в небольшом углублении: образуется подобие единого синуса, что свойственно *L. pardinus*, *L. rufus* (Schreber, 1777) и *L. issiodorensis* (рис. 1в) [9, 10]. Такое состояние данного признака считается ключевой характеристикой этих трех видов [10].

Левая и правая нижнечелюстные кости, экз. ПИН, № 5644/89, принадлежали одной старой особи. Ветви нижней челюсти идеально стыкуются между собой в сохранившейся части симфиза, имеют одинаковые размеры и особенности зубной морфологии (рис. 2). Угол смыкания ветвей нижней челюсти в симфизе равен 50° (как у современной *L. lynx*). По соотношению размеров



**Рис. 3.** Диаграммы соотношения размеров нижних щечных зубов (в мм) у некоторых представителей рода *Lynx* (по [11] с учетом экз. ПИН, № 5644/89): а – отношение длины к ширине m1 ( $Lm1/Wm1$ ); б – отношение длины р4 к длине m1 ( $Lp4/Lm1$ ); в – отношение длины р3 к длине m1 ( $Lp3/Lm1$ ).

$Lp3/Lm1$  экз. ПИН, № 5644/89 занимает среднее положение в поле значений *L. issiodorensis* (рис. 3). *L. pardinus* характеризуется меньшими размерами р3, р4 и m1 (рис. 3) [11].

Левый р3 сломан при жизни (альвеола его переднего корня оссифицирована), правый m1 расколот вдоль длинной оси и его лабиальная часть отсутствует. Оставшиеся зубы имеют следы значительного износа, особенно на вершинах бугорков, в их лабиальной части (рис. 2). Особенность морфологии нижней челюсти *L. issiodorensis* – компактность щечного зубного ряда р3–m1 (при более крупных размерах челюсти  $Lp3-m1$  у нее меньше, чем у *L. lynx*). Превосходство в длине челюсти у *L. issiodorensis* обеспечивается за счет большего размера области массетерной ямки. Эта особенность выражается отношением  $Lp3-m1/La-p3$  (табл. 2). Данные различия в пропорциях отражают только индивидуальную изменчивость. Форма венечного и углового отростков, длина диастемы, положение заднего края симфиза и другие детали морфологии нижней челюсти у *L. issiodorensis* и *L. lynx* очень сходны.

В строении зубов экз. ПИН, № 5644/89 имеются следующие особенности. Главный бугорок р3 невысокий (длина зуба больше его высоты), в отличие от экземпляра из Аполлонии-1, Греция [12]. Для *L. issiodorensis* характерно развитие переднего базального бугорка р3, который хорошо выражен и на экз. ПИН, № 5644/89а (рис. 2а). Последний премоляр р4 имеет очень крупный базальный бугорок, высота р4 меньше длины (строение сходно с р4 экз. ТВ-5 из нижнего виллафранка Греции [13]). На экз. ПИН, № 5644/89  $Lm1$  больше среднего значения для вида. При этом по массивности зуба ( $Wm1$ ) он занимает одно из первых мест в выборке (рис. 3). По длине лезвие параконида равно лезвию протоконида. Высота параконида равна высоте протоконида. Задний гребень протоконида хорошо развит. Талонид рудиментарный, метаконид отсутствует, что типично для *L. issiodorensis* (рис. 2). Прикорневая часть альвеолярного края челюсти в области обоих m1 имеет следы патологической дегенерации (рис. 2а, 2в), вероятно, связанной с периодонтитом.

*L. issiodorensis* близка по краниальной морфологии к *L. lynx* и *L. canadensis* Kerr, 1792. Наиболее надежным признаком, разделяющим их, является полуобъединенное состояние заднего рваного отверстия и подъязычного отверстия (их расположение в едином углублении) у *L. issiodorensis*. Такое полуобъединенное состояние этих отверстий характерно также для современных и ископаемых *L. pardina*. Считается, что *L. issiodorensis*, *L. pardina* и *L. rufus* отличаются от *L. lynx* и *L. canadensis* еще одним краниальным признаком – отсутствием сагиттального гребня [9, 10]. Однако развитие са-

**Таблица 2.** Размеры нижней челюсти и зубов (p3, p4, m1) *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828) и *L. lynx* (Linnaeus, 1758) (L – длина, W – ширина; Ld – длина диастемы)

Вид, экземпляр, местонахождение	p3		p4		m1		Ld	Lp3–m1
	L	W	L	W	L	W		
<i>L. issiodorensis</i> , экз. ПИН, № 5644/89; Таврида, Крым, Россия	10.2	5.8	13.3	6.8	15.1	7.3	8.0	38.4
<i>L. issiodorensis</i> , экз. FP1-2001-0120; Фонелас Р-1, Гранада, Испания [14]	9.3	4.6	11.4	5.3	14.1	5.8	9.8	34.7
<i>L. issiodorensis</i> , экз. APL-14; Аполлония 1, Греция [13]	9.8	5.3	11.6	6.0	13.8	6.8	8.5	35.0
<i>L. issiodorensis</i> , экз. СА-101; пещеры Альманзора, Испания [11]	9.7	4.2	12.1	5.3	13.6	5.9	8.3	34.4
<i>L. issiodorensis</i> , экз. SBAU 167337; Панталла, Перуджа, Италия [8]	9.4	–	11.0	–	14.5	–	10.8	35.2
<i>L. issiodorensis</i> [17, табл. X(I), фиг. 1–3], Туркобуния (ТВ-5), Греция [12, 17]	10.2	6.1	15.2	7.2	16.2	8.6	11.2	40.4
<i>L. lynx</i> , ЗММУ, n = 24	8.5–11.1	4.6–6.1	11.3–12.4	5.3–6.4	14.1–16.2	5.5–7.3	5.3–11.1	34.5–40.2

гиттального гребня у *L. lynx* очень изменчиво. В то же время черепа *L. issiodorensis* из Сен-Валье, Перье и Панталлы имеют сагиттальный гребень. У черепов из Италии и Испании, отнесенных к *L. pardina*, сагиттальный гребень тоже иногда сформирован (экз. ING 76) [10]. Таким образом, степень развития этого признака у *Lynx* варьирует.

По морфологии посткраниального скелета виды *Lynx* неотличимы.

Сравнение находок из пещеры Таврида с материалами по *L. issiodorensis* [6–8, 10, 11, 14] позволяет заключить, что крымские экземпляры принадлежат этому виду. Они имеют минимальное сходство с наиболее уклоняющейся формой вида *L. issiodorensis valdarnesis*. В этой статье мы не рассматриваем подвиды исуарской рыси. Обзор разнообразия форм, объединяемых в *L. issiodorensis*, и уровень изменчивости краниологических признаков у ископаемых и современных представителей *Lynx* приводят к заключению о недостаточной разработанности таксономии ископаемых рысей рубежа плиоцена–плейстоцена в Евразии.

*Lynx issiodorensis* иногда считается прямым предком всех современных видов рода *Lynx* [15]; при этом несоответствие ряда признаков этой гипотезе объясняется реверсивной эволюцией. Анализ ДНК современных Felidae не подтверждает эту гипотезу [16].

Экземпляры *L. issiodorensis* из пещеры Таврида являются типичными представителями данного вида – как по размерам, так и по пропорциям черепа, зубов и деталям их морфологии. При этом отмеченные выше особенности строения черепа *L. issiodorensis* из европейских местонахождений

свидетельствуют о высокой внутривидовой краниологической изменчивости.

Находка *L. issiodorensis* в Крыму подтверждает ранее определенный поздневиллафранкский возраст костеносного слоя пещеры Таврида [1, 2] и является связующим звеном между восточной и западной частями ареала этого вида в раннем плейстоцене.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др. Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
2. Вислобокова И.А., Тумов В.В., Лавров А.В., и др. Раннеплейстоценовые винторогие антилопы (*Artiodactyla*, Bovidae) из пещеры Таврида (Крым, Россия) // Палеонтологический журнал. 2020. № 1. С. 78–88.
3. Гимранов Д.О., Лавров А. В., Старцев Д.Б., и др. Первая находка этрусского медведя (*Ursus etruscus*, Ursidae, Carnivora) в Крыму (пещера Таврида, ранний плейстоцен) // Доклады РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 491. № 1. С. 130–133.
4. Оксиденко П.В., Лавров А.В. История формирования пещеры Таврида – памятника фауны позвоночных позднего виллафранка // Вестник МГУ. Сер. геогр. 2021. № 1. С. 27–42.
5. Лавров А.В., Гимранов Д.О., Старцев Д.Б., Зайцев Б.А. Саблезубые кошки (Carnivora, Felidae, Machairodontinae) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым // Доклады РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 495. С. 567–571.
6. Kurtén B. The lynx from Etouaires, *Lynx issiodorensis* (Croizet and Jobert), Late Pliocene // Annales Zoologici Fennici. 1978. V. 15. P. 314–322.

7. *Viret M.J.* Le loess a bancs durcis de Saint-Vallier (Drôme) et sa faune de mammifères villafranchiens // Nouvelles Archives du Muséum d'Histoire Naturelle de Lyon. 1954. V. 4. P. 1–195.
8. *Cherin M., Iurino D.A., Sardella R.* New well-preserved material of *Lynx issiodorensis valdarnensis* (Felidae, Mammalia) from the Early Pleistocene of Pantalla (central Italy) // Bollettino della Società Paleontologica Italiana. 2013. V. 52. № 2. P. 103–111.
9. *García-Perea R., Gisbert J., Palacios F.* Review of the biometrical and morphological features of the skull of the Iberian lynx, *Lynx pardinus* (Temminck, 1824) // Säugetierkundl. Mitt. 1985. V. 32. P. 249–259.
10. *Boscaini A., Madurell-Malapeira J., Llenas M., Martínez-Navarro B.* The origin of the critically endangered Iberian lynx: speciation, diet and adaptive changes // Quaternary Science Reviews. 2015. V. 123. P. 247–253.
11. *Montoya P., Morales J., Sendra J.* Una mandíbula de *Lynx issiodorensis* (Croizet y Jobert, 1828) (Carnivora, Mammalia) en el Plioceno inferior de Cuevas de Almanzora (Almería, España) // Revista Española de Paleontología. 2001. Núm. ext. P. 125–131.
12. *Koufos G.D.* The Villafranchian carnivoran guild of Greece: implications for the fauna, biochronology and paleoecology // Integrative Zoology. 2014. V. 9. P. 444–460.
13. *Koufos G.D.* The Pleistocene carnivores of the Mygdonia basin (Macedonia, Greece) // Annales de Paléontologie. 1992. V. 78. P. 205–257.
14. *Garrido G.* Linceos y guepardos (Felidae, Carnivora, Mammalia) en el Plioceno superior terminal del Fonelas P-1 (Cuenca de Guadix, Granada) // Cuadernos del Museo Geominero. 2008. № 10. P. 231–249.
15. *Werdelin L.* The evolution of lynxes // Annales Zoologici Fennici. 1981. V. 18. P. 37–71.
16. *Li G., Davis B.W., Eizirik E., Murphy W.J.* Phylogenomic evidence for ancient hybridization in the genomes of living cats (Felidae) // Genome Research. 2016. V. 26. № 1. P. 1–11.
17. *Symeonidis N., De Vos J.* Grossäuger-Funde aus den Pleistozänen spaltenfüllungen von Turkovunia in Athen // Annales géologiques des Pays helléniques. 1977. V. 28. P. 135–144.

## EARLY PLEISTOCENE *LYNX ISSIODORENSIS* (FELIDAE, CARNIVORA) FROM THE TAURIDA CAVE, CRIMEA

**A. V. Lavrov<sup>a</sup>, D. O. Gimranov<sup>b,#</sup>, B. A. Vakhrushev<sup>c</sup>, and Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: djulfa250@rambler.ru*

The cranial and mandibular remains of two adult individuals of *Lynx issiodorensis* (Croizet et Jobert, 1828) are described from the Early Pleistocene locality of the Taurida cave (Crimea, Late Villafranchian, 1.8–1.5 Ma). This lynx species was a typical representative of the Villafranchian fauna of the Eastern Mediterranean. A high craniological variability of *L. issiodorensis* is noted.

*Keywords:* *Lynx issiodorensis*, Late Villafranchian, Taurida cave, Crimea, premolars, lower molar, sagittal crest, intraspecific variability

УДК 594.14+591.491

## ПЕРВАЯ НАХОДКА ПОГОНОФОР (*Annelida*, *Siboglinidae*) В ВОСТОЧНО-СИБИРСКОМ МОРЕ СОВПАДАЕТ С РАЙОНАМИ МЕТАНОВЫХ ПРОСАЧИВАНИЙ

© 2021 г. Н. П. Карасева<sup>1</sup>, Н. Н. Римская-Корсакова<sup>1</sup>, И. А. Екимова<sup>1</sup>, В. Н. Кокарев<sup>2</sup>,  
М. И. Симаков<sup>3</sup>, М. М. Ганцевич<sup>1,\*</sup>, академик РАН В. В. Малахов<sup>1</sup>

Поступило 05.07.2021 г.  
После доработки 16.07.2021 г.  
Принято к публикации 16.07.2021 г.

В Восточно-Сибирском море впервые обнаружены погонофоры (*Annelida*, *Siboglinidae*). На основе молекулярно-филогенетического анализа найденные экземпляры предположительно отнесены к роду *Oligobrachia*. Станции, на которых обнаружены погонофоры, находятся в районе, где выявлены метановые просачивания. Это подтверждает ранее высказанную гипотезу о связи погонофор с районами подводных просачиваний метана.

**Ключевые слова:** погонофоры, биогеография, Восточно-Сибирское море, Арктика, метановые просачивания, *Oligobrachia*, *Siboglinidae*, *Frenulata*, *Annelida*

DOI: 10.31857/S2686738921060044

*Siboglinidae* Caullery, 1914 – это группа морских беспозвоночных, жизнедеятельность которых обеспечивается за счет симбиотических хемоавтотрофных или гетеротрофных бактерий, обитающих внутри клеток специального органа – трофосомы. По современным данным *Siboglinidae* – это одно из семейств седентарных *Annelida* [1]. Френулятные погонофоры (*Frenulata*) – самая многочисленная по числу видов группа сибоглинид, в трофосоме которых могут обитать как сульфид-окисляющие, так и метан-окисляющие симбионты [2]. В районах углеводородных просачиваний в толще осадка при участии микроорганизмов происходит окисление метана за счет сульфатов, в результате чего создаются высокие концентрации сульфидов [3, 4]. Вот почему френулятные погонофоры, содержащие не только метан-окисляющих, но и сульфид-окисляющих симбионтов, обитают в районах углеводородных просачиваний. Ранее [5, 6] на примере Охотского моря была высказана гипотеза о том, что распределение погонофор коррелирует с районами высоких концентраций метана в осадке и в придон-

ной воде. В российском секторе Арктического бассейна, до настоящего момента, френулятные погонофоры были известны только в Баренцевом и Карском морях, а также в море Лаптевых [7–9]. Настоящая статья представляет собой сообщение о первой находке погонофор в Восточно-Сибирском море.

В ходе работ в 69-го рейса НИС “Академик Мстислав Келдыш” Института океанологии РАН им. П.П. Ширшова 27/07/2016 на станциях 5602 (73°14' с.ш., 156°26.2' в.д.) и 5606 (75°38' с.ш., 161°59.9' в.д.) на глубине 26 и 48 м, соответственно, были найдены трубки погонофор с фрагментами мягкого тела. На обеих станциях осадок представлял собой алевритово-пеллитовый ил, температура придонной воды составляла –1.4°C и –1.8°C, соленость придонного слоя воды 32.6 и 31.8‰ на станциях 5602 и 5606 соответственно. Одна неполная трубка со станции 5602 была зафиксирована в параформе и три неполных трубки со станции 5606 были зафиксированы в 96% этиловом спирте. Два неполных экземпляра погонофор были извлечены из двух трубок со станции 5606.

Сайты находок погонофор в Восточно-Сибирском море расположены в западной и северо-западной частях шельфа Восточно-Сибирского моря. Станции 5602 и 5606 располагались, соответственно, на юго-восток и на юго-запад от острова Новая Сибирь (рис. 1).

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Факультет биологических наук и аквакультуры, Северный университет, Буде, Норвегия

<sup>3</sup> Институт океанологии имени П.П. Ширшова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: mgantsevich@gmail.com



**Рис. 1.** Карта Восточно-Сибирского моря с указанием станций, на которых обнаружены погонофоры *Oligobrachia* (отмечены звездочками) и полигона, на котором обнаружены метановые факелы (прямоугольник).

Трубки, обнаруженные на обеих станциях, имели идентичное строение: передняя часть трубок пленчатая, мягкая и полупрозрачная, остальная часть трубки упругая, визуально разделена прозрачными кольцами на сегменты (рис. 2).

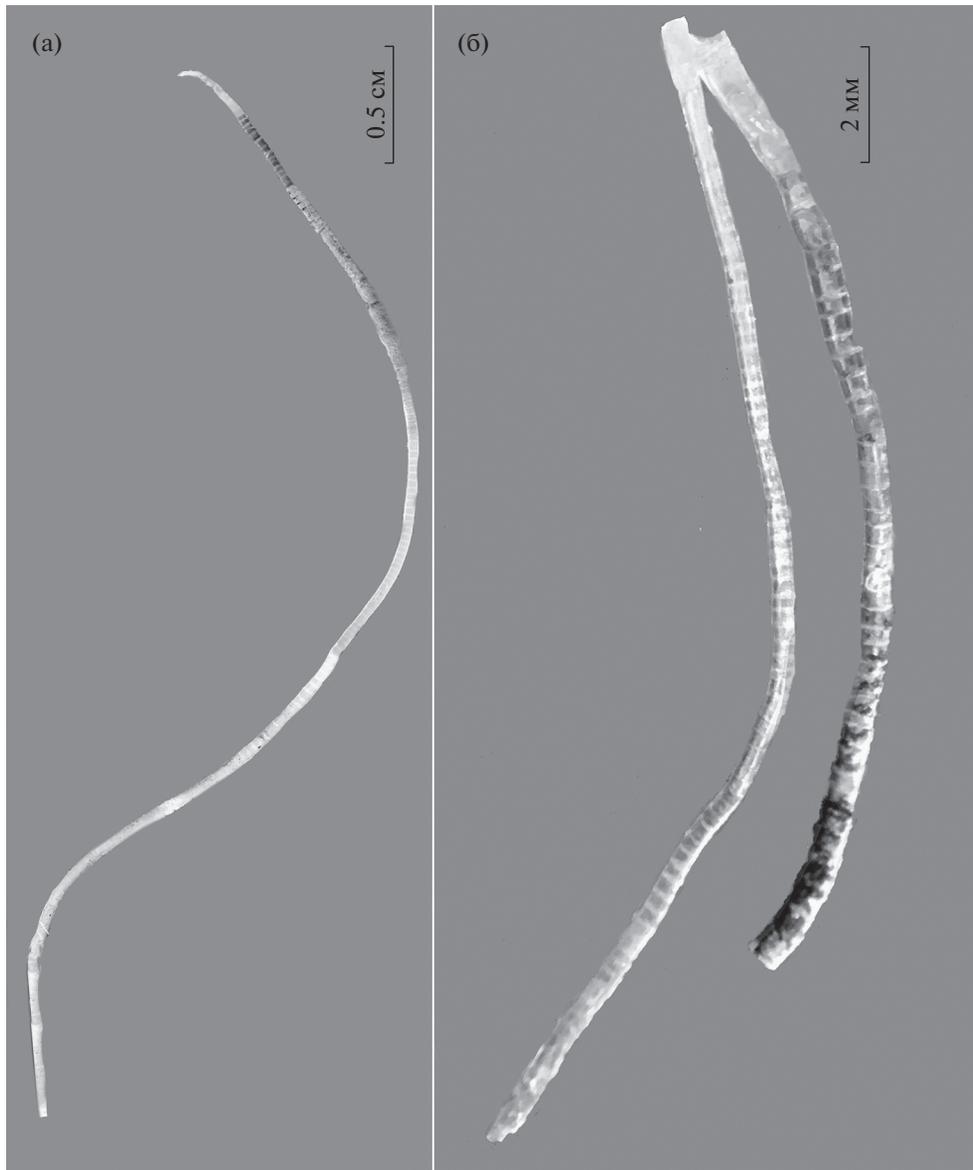
Трубки окрашены в желтоватые тона до оранжевого цвета, местами трубки имеют темно-бурю окраску. Диаметр трубок составляет 0.7–0.9 мм и практически постоянен на протяжении длины имеющихся фрагментов. Морфология трубок позволила сделать предположение о близости найденных экземпляров к роду *Oligobrachia*, однако плохая сохранность мягкого тела не позволила сделать морфологическое описание найденных экземпляров. Для надежного определения таксономической принадлежности найденных погонофор мы воспользовались методом молекулярно-филогенетического анализа. Несмотря на то что для анализа нами был использован материал только с одной станции, идентичная морфология трубок, найденных на обеих станциях, дает основание относить все найденные экземпляры к одному и тому же виду.

Всего для проведения данного молекулярно-филогенетического анализа нами были использованы 106 последовательностей, 6 из них принадлежали новым находкам из Восточно-Сибирского моря, остальные 100 принадлежали различным таксонам погонофор и представителям рода *Scler-*

*olinum* Southward, 1961. Все последовательности были ранее опубликованы в ГенБанке NCBI. Выравнивание последовательностей включало 2562 позиции пар нуклеотидов. Реконструкция филогенетического дерева была выполнена с помощью Байесовского анализа (Bayesian Inference, BI) в программе MrBayes 3.1.2. по объединенным последовательностям четырех фрагментов генов (COI, 16S, 18S, 28S). Финальные филогенетические реконструкции были визуализированы в программе Fig Tree Drawing Tool v.1.4.0. Полученное филогенетическое дерево представлено на рис. 3.

На представленном дереве все три вида арктических видов *Oligobrachia* формируют общую кладу с апостериорной вероятностью  $p = 1$ , каждый вид в отдельности также формирует монофилетические клады с высокой степенью поддержки ( $p = 1$ ). Найденные в Восточно-Сибирском море погонофоры образуют монофилетическую кладу с представителями *Oligobrachia* CPL-clade ( $p = 1$ ). Таким образом, новые находки погонофор из Восточно-Сибирского моря предположительно следует отнести к роду *Oligobrachia*.

Первым видом погонофор рода *Oligobrachia*, найденным в арктических водах, был *O. haakonmosbiensis* Smirnov, 2000, который имеет прерывистый ареал, охватывающий Норвежское море, северо-западную часть Баренцева моря и море Лап-

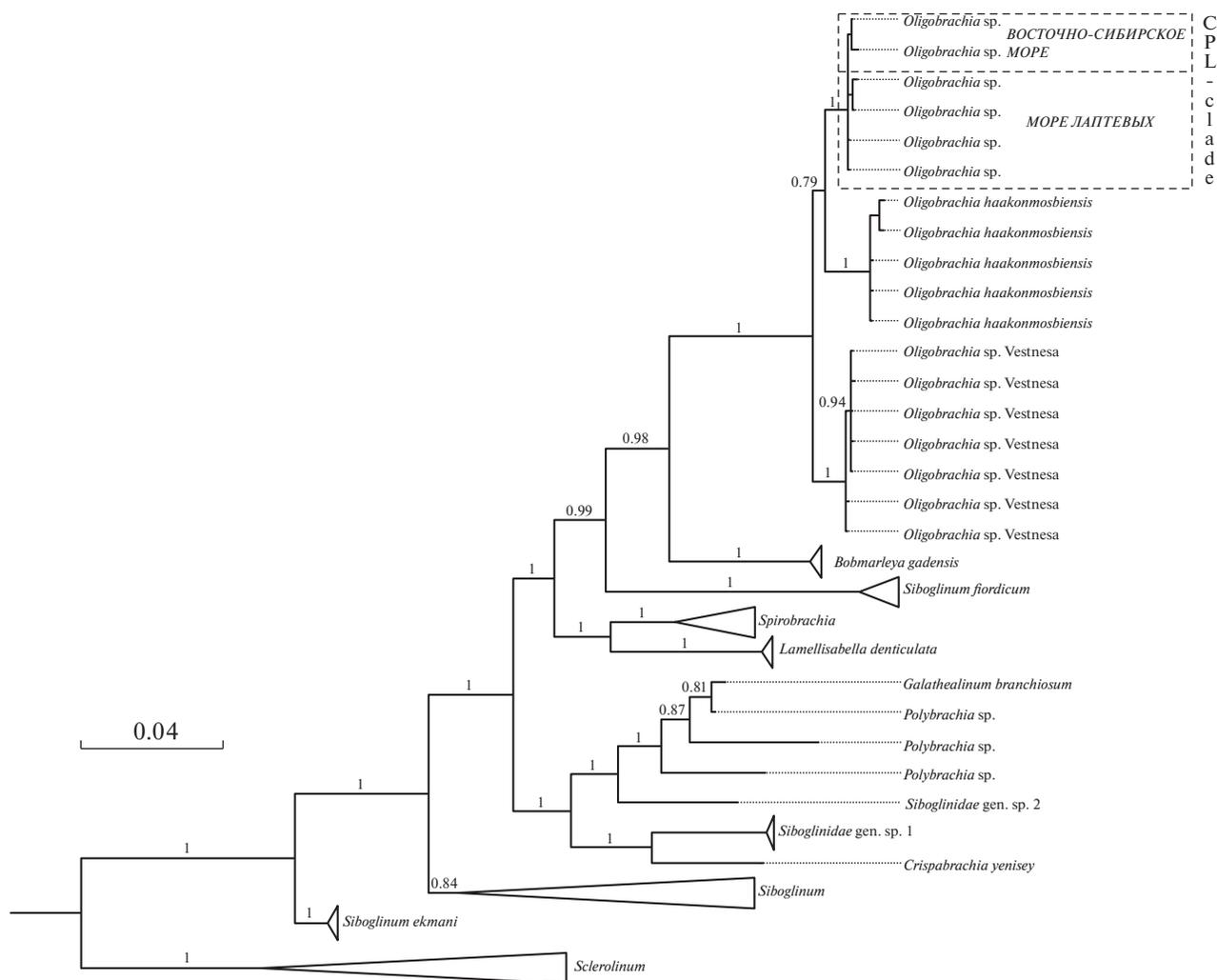


**Рис. 2.** Трубки *Oligobrachia* sp. CPL-clade из Восточно-Сибирского моря. а – трубка со станции 5602 (масштаб 0.5 см), б – передние концы трубок, обнаруженных на станции 5606 (масштаб 2 мм).

тевых [8]. Сен с соавт. [10, 11] показали, что находки погонофор, обозначенных как *O. haakonmosbiensis*, в действительности представляют собой находки представителей комплекса криптических видов.

Эти виды плохо различаются по морфологическим особенностям, однако при молекулярно-филогенетическом анализе образуют 3 хорошо различимых кластера, которые можно рассматривать как три отдельных вида [10, 11]. Типовой вид *O. haakonmosbiensis* распространен в Норвежском море на востоке в нескольких точках вдоль границы шельфа (721–1303 м). Второй вид, обозначенный как *Oligobrachia* CPL-clade, имеет широкий ареал от архипелага Шпицберген на границе

Норвежского и Баренцева моря до Восточно-Сибирского моря (включая данную находку) на глубине (26–380 м) [8, 10]. Третий вид, обозначенный как *Oligobrachia* sp. Vestnesa, известен только из двух местонахождений в районе хребта Вестнеса на северо-западе от архипелага Шпицберген на глубине 1200 м, где также встречается типовой вид *O. haakonmosbiensis* [11]. Кроме того, погонофоры сходной морфологии были описаны к северо-востоку от архипелага Шпицберген на глубинах 2090–2166 м, однако без молекулярно-филогенетического анализа невозможно точно установить, относятся ли данные погонофоры к типовому виду *O. haakonmosbiensis* или одному из



**Рис. 3.** Положение *Oligobrachia* sp. CPL-clade из Восточно-Сибирского моря на филогенетическом дереве френулятных погонофор, построенном по методу Байеса по матрице конкатенированных последовательностей 4 генов (COI, 16S, 18S, 28S). Цифры над ветвями указывают апостериорные вероятности.

двух пока не описанных *Oligobrachia* CPL-clade или *Oligobrachia* sp. Vestnesa [8].

Все представители арктических олигобрахий (*O. haakonmosbiensis*, *Oligobrachia* CPL-clade и *Oligobrachia* sp. Vestnesa) описаны из различных биотопов, ассоциированных с подводными метановыми проявлениями – сипами, кратерами, грязевыми вулканами и покмарками [7, 8, 10–12]. Представители рода *Oligobrachia* (которые, вероятно, соответствуют *Oligobrachia* CPL-clade) найдены в море Лаптевых только в районах метановых просачиваний и не были обнаружены ни на одной из станций с фоновыми концентрациями метана [8]. Станция 5606, на которой были обнаружены представители рода *Oligobrachia* в Восточно-Сибирском море, практически совпадает с полигоном, на котором зарегистрированы метановые факелы [13]. Прямых измерений концентрации метана на станции 5602 не было. Можно

только предполагать, что в этом районе высокие концентрации метана, необходимые для жизнедеятельности погонофор, могут возникать за счет деградации вечной мерзлоты под воздействием речного стока [14]. В целом имеющиеся данные показывают, что и в арктических морях погонофоры могут выступать как индикаторы метановых просачиваний.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФ в рамках научного проекта № 18-14-00141-П.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения или принятой практике для таких исследований.

Информированное согласие было получено от всех участников исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weigert A., Bleidorn C. Current status of annelid phylogeny // *Organisms Diversity & Evolution*. 2016. V. 16. № 2. P. 345–62.
2. Hilario A., Capa M., Dahlgren T.G., et al. New Perspectives on the Ecology and Evolution of Siboglinid Tubeworms // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. № 2. P. e16309.
3. Naganuma T., Elsaied H.E., Hoshii D., et al. Bacterial endosymbioses of gutless tube-dwelling worms in non-hydrothermal vent habitats // *Mar. Biotechnol.* 2005. V. 7. P. 416–428.
4. Lösekann T., Robador A., Niemann H., et al. Endosymbioses Between Bacteria and Deep-Sea Siboglinid Tubeworms from an Arctic Cold Seep (Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea) // *Environ. Microbiol.* 2008. V. 10. № 12. P. 3237–3254.
5. Карасева Н.П., Ганцевич М.М., Обжиров А.И., и др. Сибоглиниды (Annelida, Siboglinidae) как возможные индикаторы углеводородов на примере Охотского моря // Доклады Академии наук, издательство Наука (М.). 2019. Т. 486. № 1. С. 127–130.
6. Karaseva N., Gantsevich M., Obzhairov A., et al. Correlation of the siboglinid (Annelida: Siboglinidae) distribution to higher concentrations of hydrocarbons in the Sea of Okhotsk // *Marine Pollution Bulletin*. 2020. V. 158. P. 1–9.
7. Ivanov A.V. Pogonophora. *Carlisle DB*, editor. London: Academic Press, 1963. P. 1–479.
8. Smirnov R.V. A revision of the Oligobrachiidae (Annelida: Pogonophora), with notes on the morphology and distribution of *Oligobrachia haakonmosbiensis* Smirnov // *Marine Biology Research* [Internet]. 2014. V. 10. № 10. P. 972–82.
9. Smirnov R.V., Zaitseva O.V., Vedenin A.A. A remarkable pogonophoran from a desalted shallow near the mouth of the Yenisey River in the Kara Sea, with the description of a new species of the genus *Galathealinum* (Annelida: Pogonophora: Frenulata) // *Zoosystematica Rossica*. 2020. V. 29. № 1. P. 138–54.
10. Sen A., Duperron S., Hourdez S., et al. Cryptic frenulates are the dominant chemosymbiotrophic fauna at Arctic and high latitude Atlantic cold seeps // *PLOS ONE* [Internet]. 2018. V. 13. № 12. P. 1–29.
11. Sen A., Didriksen A., Hourdez S., et al. Frenulate siboglinids at high Arctic methane seeps and insight into high latitude frenulate distribution // *Ecology and Evolution*. 2020. V. 10. № 3. P. 1339–51.
12. Baranov B., Galkin S., Vedenin A., et al. Methane seeps on the outer shelf of the Laptev Sea: characteristic features, structural control, and benthic fauna // *Geo-Mar Lett* 2020. V. 40. P. 541–557.
13. Амбросимов А.К. Метановые сипы и гидрофизические аномалии Восточно-Сибирского моря как отклик на климатические изменения // *Экологические системы и приборы*. 2020. № 12. С. 48–53.
14. Семилетов И.П., Дударев О.В., Дмитриевский Н.Н., и др. Изучение климатической роли деградации подводной мерзлоты как фактора массивированных выбросов основных парниковых газов в атмосферу над Восточно-арктическими морями России (78-й рейс НИС “академик Мстислав Келдыш”). Итоги экспедиционных исследований в 2018 году в Мировом океане, внутренних водах и на архипелаге Шпицберген: Материалы конференции: электронный ресурс, Москва, 18–19 февраля 2019 года. — Москва: Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, 2019. С. 157–173.

## THE FIRST DISCOVERY OF POGONOPHORES (Annelida, Siboglinidae) IN THE EAST SIBERIAN SEA COINCIDES WITH THE AREAS OF METHANE SEEPS

N. P. Karaseva<sup>a</sup>, N. N. Rims kaya-Korsakova<sup>a</sup>, I. A. Ekimova<sup>a</sup>, V. N. Kokarev<sup>b</sup>, M. I. Simakov<sup>c</sup>, M. M. Gantsevich<sup>a,\*</sup>, and Academician of the RAS V. V. Malakhov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Faculty of Biosciences and Aquaculture, Nord University, Bodø, Norway

<sup>c</sup> Shirshov Institute of Oceanology, Moscow, Russian Federation

\*e-mail: mgantsevich@gmail.com

Pogonophores (Annelida, Siboglinidae) were first discovered in the East Siberian Sea. Based on molecular phylogenetic analysis, the found specimens are presumably assigned to the genus *Oligobrachia*. The stations where the pogonophores were found are located in the area where methane seeps were detected. This confirms the previously stated hypothesis about the connection of pogonophores with areas of underwater methane seepage.

**Keywords:** pogonophores, biogeography, East Siberian Sea, Arctic, methane seeps, *Oligobrachia*, Siboglinidae, Frenulata, Annelida

УДК 616–092.19:57.017.3

## НОВЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КРИТЕРИИ ПРОФИЛЯ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА – ТРИГГЕРА ДИСФУНКЦИИ НАДПОЧЕЧНИКОВ

© 2021 г. М. В. Кондашевская<sup>1,\*</sup>, М. В. Комелькова<sup>2,3</sup>, В. Э. Цейликман<sup>2</sup>, О. Б. Цейликман<sup>2,3</sup>,  
К. А. Артемьева<sup>1</sup>, В. В. Алексанкина<sup>1</sup>, М. Н. Болтовская<sup>1</sup>, А. П. Сарапульцев<sup>2,4</sup>, П. Н. Попков<sup>5</sup>,  
М. В. Черешнева<sup>4</sup>, академик РАН В. А. Черешнев<sup>4</sup>

Поступило 02.07.2021 г.

После доработки 21.07.2021 г.

Принято к публикации 21.07.2021 г.

Впервые при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) охарактеризовано морфофункциональное состояние надпочечников устойчивых и неустойчивых к предаторному стрессу (страх грызунов перед хищником) крыс Вистар. Несмотря на выраженные признаки дисфункции адреналовых желёз у обоих фенотипов, у устойчивых животных выявлены утолщение камбиальной зоны и высокие значения индекса функциональной активности стволовых клеток этой зоны, что свидетельствует о продуктивной адаптации. Приоритетными являются данные о непосредственной связи между снижением уровня кортикостерона и тестостерона с надпочечниковой недостаточностью при моделировании ПТСР. Полученные в работе сведения позволяют рассматривать стволовые клетки надпочечников в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

*Ключевые слова:* крысы Вистар, посттравматическое стрессовое расстройство, морфофункциональная характеристика надпочечников, стволовые клетки надпочечников, устойчивость к стрессу

**DOI:** 10.31857/S2686738921060056

Опасное заболевание, провоцируемое вирусом из семейства коронавирусов, первоначально вспыхнувшее в Китае в конце 2019 г., быстро распространилось по всем континентам. В январе 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) дала официальное название коронавирусу – COVID-19, а в марте была объявлена пандемия. Пандемии и эпидемии всегда имеют массу негативных последствий социально-политического, экономического, социально-психологиче-

ского и ситуационного характера, поэтому они связаны с неблагоприятным влиянием на психическое здоровье населения. Уже в середине 2020 г. появились многочисленные свидетельства о том, что во всех странах у населения обнаружился высокий процент симптоматики посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Характерными особенностями ПТСР являются, во-первых, отсроченное проявление симптомов и, во-вторых – развитие заболевания не у всех стрессированных индивидуумов [1]. Так, например, по сведениям эпидемиологических исследований, в Китае среди 2450 студентов колледжей, помещенных на домашний карантин, распространенность ПТСР и депрессии составила 2.7 и 9.0% соответственно [2]. Таким образом, в настоящее время существует острая необходимость активно исследовать механизмы формирования адаптивного ответа при ПТСР. В настоящее время в приоритете работы, рассматривающие в деталях отклик организма восприимчивых и устойчивых к развитию ПТСР индивидов, или особей. Определение молекулярной, клеточной и морфофункциональной основы индивидуальных различий в реакции на стресс имеет решающее значение для понимания патофизиологии и лечения

<sup>1</sup> ФГБНУ “Научно-исследовательский институт морфологии человека им. Академика А.П. Авцына”, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО “Южно-Уральский государственный университет (Национальный исследовательский университет)”, Челябинск, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО “Челябинский государственный университет”, Челябинск, Россия

<sup>4</sup> ФГБНУ “Институт иммунологии и физиологии УрОРАН”, Екатеринбург, Россия

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО “Южно-Уральский государственный медицинский университет” Минздрава России, Челябинск, Россия

\*e-mail: marivladiko@mail.ru

ПТСР [3, 4]. До сих пор остается не вполне ясным морфофункциональное состояние надпочечников (адреналовых желёз) – существенного источника гормонов-регуляторов многих ключевых процессов в организме млекопитающих и важного элемента гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы. Отсутствуют сведения о сравнении надпочечников неустойчивых и устойчивых к стрессу особей.

Цель исследования – при моделировании посттравматического стрессового расстройства определить интегральные показатели морфофункционального состояния надпочечников крыс Вистар, произвести сравнение показателей устойчивых и неустойчивых к стрессу особей.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена в осенне-зимний период на половозрелых крысах-самцах Вистар ( $n = 60$ ) с исходной массой тела 180–200 г. Животных содержали по 10 особей. ПТСР воспроизводили, используя общепризнанную модель предаторного стресса – эволюционно закрепленного, избирательного страха грызунов перед хищником и его запахом, разработанную Hagit Cohen и Joseph Zohar и усовершенствованную Vadim Tseilikman и соавт. [5, 6]. В работах Vera Voznessenskaya и соавт., а также Raimund Apfelbach и соавт. показано, что воздействие запаха хищника настолько значительно для грызунов, что активирует не только поведенческий рефлекс – бегство, но и abortивную реакцию у беременных самок [7–9]. Были сформированы 2 группы: 1-я – интактные крысы ( $n = 20$ ); 2-я – животные, подвергаемые предаторному стрессу (кошачья моча) по 10 мин в течение 10 сут с последующим содержанием в течение 14 сут в обычных условиях (ПТСР) ( $n = 40$ ). Все экспериментальные процедуры проводили согласно требованиям “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (1984) и в соответствии с директивой Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях” (от 22.09.2010).

Для выявления поведенческих проявлений развития ПТСР, животных в конце эксперимента тестировали в течение 10 мин (600 с) в “Приподнятом крестообразном лабиринте” (ПКЛ). Вычисляли разработанный Н. Cohen и соавт. индекс тревожности (ИТ), по формуле:  $ИТ = 1 - [(ВОР/ВТ + ЧЗОР/ОЧЗ)/2]$ , где ВОР – время нахождения в открытых рукавах ПКЛ, ВТ – время тестирования в с, ЧЗОР – число заходов в открытые рукава, ОЧЗ – общее число заходов в рукава [10].

Крыс выводили из эксперимента передозировкой золетила. Левые надпочечники фиксиро-

вали в жидкости Буэна, заливали в парафин. Гистологические экваториальные срезы надпочечников толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. При помощи морфометрической программы AxioVision на микрофотографиях, полученных с помощью микроскопа AxioPlan 2 imaging, производили на каждом срезе 10 измерений толщины функциональных зон коркового вещества и диаметра кариона эндокриноцитов. Рассчитывали индекс функциональной активности адренокортикоцитов каждой зоны по формуле:  $ИФА = (ТФЗ * СДК)/100$ , где ТФЗ – толщина функциональной зоны, СДК – средний диаметр кариона, рассчитанный по формуле:  $\sqrt{\text{Макс} * \text{Мин}}$  [11].

В сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли уровень кортикостерона “IBL” (Германия) и тестостерона DBC (Канада), используя иммуноферментный анализатор ANTHOS (Австрия).

Сравнение экспериментальных групп производили при помощи ANOVA, критерия Краскела–Уоллиса для множественных сравнений, U-критерия Манна–Уитни для парных сравнений. Результаты выражали как  $Me (Q_n; Q_v)$  – медиана, нижний и верхний квартили. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общеизвестно, что ПТСР развивается далеко не у всех субъектов (людей и животных), подвергавшихся одинаковому стрессу [1, 2]. При тестировании крыс в ПКЛ установлено, что по сравнению с контрольными и устойчивыми к стрессу крысами, неустойчивые особи характеризовались более выраженным анксиогенным эффектом, проявляющимся в снижении времени нахождения в открытых рукавах ПКЛ, числа заходов в них и локомоторной активности (табл. 1). Показатели устойчивых к стрессу особей отличались от контрольных лишь по времени нахождения в открытых рукавах ПКЛ, которые, так же, как и у неустойчивых крыс, уменьшались, однако были в 5.6 раза выше, чем у низкоустойчивых особей. Правомерность фенотипирования популяции, в дополнение к вышеуказанным показателям, подтверждалась интегральным параметром – индексом тревожности, который был достоверно значимо повышен у неустойчивых к стрессу животных, тогда как значения этого параметра устойчивых особей не отличались от контроля (табл. 1).

Сравнение содержания кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови продемонстрировало снижение содержания определяемых гормонов у всех стрессированных крыс (табл. 1).

**Таблица 1.** Показатели поведения крыс Вистар в “Приподнятом крестообразном лабиринте”, уровня тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови при моделировании посттравматического стрессового расстройства Ме ( $Q_H$ ;  $Q_B$ )

Показатель	Контроль (1)	Высокоустойчивые к стрессу крысы (2)	Низкоустойчивые к стрессу крысы (3)
Время нахождения в открытых рукавах, с	178.6 (136.3; 228.8)	106.7*# (55.1; 165.1) $p_{1-2} = 0.0029$ $p_{2-3} = 0.0001$	19.2 (67.1; 38.3)*# $p_{1-3} = 0.0001$
Число заходов в открытые рукава, усл. ед.	4.9(2.8; 9.8)	5.2 (3.9; 6.3)# $p_{1-2} = 0.7103$ $p_{2-3} = 0.0001$	1.7 (1.0; 2.7)*# $p_{1-3} = 0.0011$
Общее число заходов в рукава, усл. ед.	16.2(11.1; 22.8)	17.5 (15.7; 25.1)# $p_{1-2} = 0.5416$ $p_{2-3} = 0.0001$	8.6 (4.2; 12.1)*# $p_{1-3} = 0.0004$
Индекс тревожности, усл. ед.	0.72(0.64; 0.81)	0.72 (0.64; 0.79)# $p_{1-2} = 0.9250$ $p_{2-3} = 0.0007$	0.91 (0.67; 0.75)*# $p_{1-3} = 0.0001$
Тестостерон (Т), нмоль/л	14.3(8.5; 22.9)	8.7 (5.6; 13.7)*# $p_{1-2} = 0.0401$ $p_{2-3} = 0.0014$	4.1 (2.8; 4.8)*# $p_{1-3} = 0.0004$
Кортикостерон, (Кор) нмоль/л	436.5 (309.9; 524.9)	275.5*# (194.3; 343.2) $p_{1-2} = 0.0004$ $p_{2-3} = 0.0014$	166.8*# (116.2; 233.2) $p_{1-3} = 0.0004$
Отношение Т/Кор	0.039 (0.021; 0.065)	0.035# (0.024; 0.051) $p_{1-2} = 0.7192$ $p_{2-3} = 0.0235$	0.025*# (0.018; 0.041) $p_{1-3} = 0.0412$

Примечание: \* – достоверно значимые отличия от контроля,

# – достоверно значимые отличия при сравнении опытных групп.

Снижение уровня кортикостерона является общепризнанным показателем развития ПТСР-подобного состояния [6, 10, 12, 13]. Тем не менее значения содержания кортикостерона у высокоустойчивых крыс были достоверно значимо выше, чем у неустойчивых (табл. 1). В нашем предыдущем эксперименте, было установлено, что еще до моделирования стресса крысы, оказавшиеся впоследствии неустойчивыми к стрессу, характеризовались более высоким уровнем кортикостерона. Удалось определить, что у устойчивых к стрессу животных преобладает цитохром P4503A-зависимый метаболизм глюкокортикоидов, а у неустойчивых – зависящий от 11 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы типа 2 [13].

Уровень тестостерона уязвимых особей оказался наиболее низким (табл. 1). Аналогичное снижение уровня тестостерона отмечено у комбантов при диагностировании выраженного ПТСР [14, 15]. Кроме того, снижение уровня тестостерона – основного анаболического гормона, обычно связано с риском развития ишемической болезни сердца и другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы [16, 17].

Необходимо акцентировать внимание на снижении интегрального показателя отношения уровня тестостерона к уровню кортикостерона у неустойчивых к стрессу животных (табл. 1). Последнее свидетельствует о преобладании у неустойчивых крыс катаболических процессов над анаболическими, что при дополнительных факторах риска чревато сбоям работы функциональных систем. В то же время этот показатель у высокоустойчивых особей не отличался от контроля (табл. 1).

Анализируя морфологическое состояние коркового вещества надпочечников, которое отражает статус гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, установлено, что после развития ПТСР-подобного состояния у всех стрессированных крыс отмечено уменьшение толщины коркового слоя надпочечников на 46.1–44.3%, происходящее в основном за счет сокращения толщины пучковой на 48.1–50.2% и сетчатой на 43.9–50.1% зон (табл. 2). При этом интегральный показатель – индекс функциональной активности клеток (ИФАК) этих зон значительно снижался при моделировании ПТСР (табл. 2). В то же время

**Таблица 2.** Показатели морфофункционального состояния коры надпочечников устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс Вистар при моделировании посттравматического стрессового расстройства Me (Q<sub>н</sub>; Q<sub>в</sub>)

Показатель	Контроль (1)	Высокоустойчивые к стрессу крысы (2)	Низкоустойчивые к стрессу крысы (3)
Толщина коры надпочечников, мкм	1094.1 (699.4; 1451.9)	608.2* (549.1; 645.6) <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.2822	589.5* (550.7; 634.5) <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001
Толщина капсулы надпочечника, мкм	12.9 (8.9; 16.5)	10.8 (8.1; 12.6)*# <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.037 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0001	7.2 (6.9; 8.8)*# <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001
Толщина камбиальной зоны, мкм	17.1 (12.3; 21.4)	32.4 (27.9; 36.4)*# <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0001	18.3 (15.2; 21.6)# <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.3042
Толщина клубочковой зоны, мкм	58.5 (53.9; 64.7)	55.5 (49.1; 62.6)# <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.1093 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0029	47.5(38.4; 57.2)*# <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001
Толщина пучковой зоны, мкм	421.3 (433.5; 609.9)	219.1* (186.8; 266.2) <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.3320	209.9* (183.2; 253.3) <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001
Толщина сетчатой зоны, мкм	467.6 (369.7; 570.9)	280.3* (258.4; 337.5) <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0463	308.7* (261.1; 333.2) <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001
Индекс функциональной активности клеток камбиальной зоны, усл. ед.	0.85 (0.56; 1.31)	2.07 (1.71; 2.78)*# <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0031	0.79 (0.48; 1.2)# <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.4712
Индекс функциональной активности клеток клубочковой зоны, усл. ед.	2.5 (1.8; 2.8)	3.1 (2.8; 3.7)*# <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0006	2.4 (2.1; 2.9)# <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.6621
Индекс функциональной активности клеток пучковой зоны, усл. ед.	22.7 (15.5; 27.5)	12.1 (10.6; 15.1)*# <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.0019	9.9 (8.3; 11.2)*# <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001
Индекс функциональной активности клеток сетчатой зоны, усл. ед.	20.5 (17.1; 24.9)	12.3 (11.1; 14.7)* <i>p</i> <sub>1–2</sub> = 0.0001 <i>p</i> <sub>2–3</sub> = 0.4031	12.9 (10.4; 14.4)* <i>p</i> <sub>1–3</sub> = 0.0001

Примечание: \* – достоверно значимые отличия от контроля, # – достоверно значимые отличия при сравнении опытных групп.

ИФАК пучковой зоны устойчивых крыс был достоверно значимо выше, чем уязвимых, тогда как значения ИФАК сетчатой зоны этих особей были сходны (табл. 2). Тем не менее более масштабные морфофункциональные трансформации наблюдались у неустойчивых к стрессу животных, у которых, в дополнение к указанным изменениям, обнаружено более существенное по сравнению с контролем и устойчивыми крысами уменьшение толщины клубочковой зоны – на 18.2 и 14.4% соответственно, сопровождающееся наименьшими показателями ИФАК этой зоны (табл. 2). Тогда как показатели ИФАК клубочковой зоны устойчивых крыс были самыми высокими, превышая

контрольные значения на 24 и 29.2% – значения неустойчивых к стрессу особей (табл. 2).

В 1994 г. группой японских исследователей была идентифицирована и охарактеризована новая зона надпочечников крыс, расположенная между клубочковой и пучковой зонами, и названная “камбиальной зоной” [18]. В последующих работах было показано, что клетки этой зоны являются стволовыми клетками, поддерживающими клеточный состав клубочковой и пучковой зон [19]. В нашем исследовании толщина камбиальной зоны неустойчивых особей оставалась на уровне контрольных величин, тогда как у устойчивых к стрессу крыс зарегистрировано очень значительное увеличение толщины камбиальной

зоны, превышающее контрольные значения на 89.5 и 77.1% – неустойчивых животных (табл. 2). При этом интегральный показатель – ИФАК камбиальной зоны устойчивых к стрессу крыс оказался наибольшим среди всех групп, он превосходил контрольные значения в 2.5 раза и в 2.7 раза – значения уязвимых животных. Вероятнее всего увеличение толщины камбиальной зоны и возрастание ИФАК устойчивых особей отражают существенную активацию адаптационных процессов гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы.

Как известно, снаружи надпочечник заключен в фиброзную капсулу, состоящую из пучков коллагеновых и эластических волокон, нескольких слоев фиброцитов и гладкомышечных клеток, идущих параллельно наружной поверхности железы. Считается, что в капсуле надпочечника находятся стволовые/прогениторные клетки, которые способны давать начало гонадоподобным клеткам и производить половые стероиды [16]. При моделировании ПТСР в нашем эксперименте толщина капсулы надпочечников устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс уменьшалась по сравнению с контролем. Тем не менее следует подчеркнуть, что толщина капсулы уязвимых к стрессу крыс была на 43.4% меньше устойчивых. Возможно, свойством стволовых/прогениторных клеток капсулы производить половые стероиды объясняется более высокий уровень тестостерона у высокоустойчивых особей, чем у неустойчивых.

Таким образом, в проведенном исследовании впервые удалось обнаружить персонифицированные морфофункциональные различия надпочечников устойчивых и неустойчивых к предаторному стрессу крыс Вистар. Несмотря на выраженные признаки дисфункции адреналовых желёз у обоих фенотипов, утолщение камбиальной зоны и высокие значения индекса функциональной активности стволовых клеток этой зоны у устойчивых особей, позволяют сделать вывод о том, что у этих животных наблюдается восстановление морфофункционального состояния надпочечников, т.е. продуктивная адаптация. Приоритетными являются данные о непосредственной связи между снижением уровня кортикоостерона и тестостерона с надпочечниковой недостаточностью при моделировании ПТСР. Полученные в работе сведения позволяют рассматривать стволовые клетки надпочечников в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают об отсутствии конфликта интересов.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках базовой части Государственного задания ФГБНУ “НИИ морфологии человека” (регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119021490067-4) и Государственного задания ФГБНУ “Институт иммунологии и физиологии УрО РАН” (регистрационный номер НИОКТР АААА-А18-118020590108-7), а также при финансовой поддержке РФФИ и Челябинской области в рамках научного проекта № 20-415-740011.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Osório C., Probert T., Jones E., et al.* Adapting to Stress: Understanding the Neurobiology of Resilience // *Behav Med.* 2017. V. 43. № 4. P. 307–322.
2. *Tang W., Hu T., Hu B., et al.* Prevalence and correlates of PTSD and depressive symptoms one month after the outbreak of the COVID-19 epidemic in a sample of home-quarantined Chinese university students // *J Affect Disord.* 2020. V. 274. P. 1–7.
3. *Colucci P., Marchetta E., Mancini G.F., et al.* Predicting susceptibility and resilience in an animal model of post-traumatic stress disorder (PTSD) // *Transl Psychiatry.* 2020. V. 10. № 1. P. 243.
4. *Torrisi S.A., Lavanco G., Maurel O.M. et al.* A novel arousal-based individual screening reveals susceptibility and resilience to PTSD-like phenotypes in mice. *Neurobiol Stress.* 2020. V. 14. P. 100286.
5. *Cohen H., Zohar J.* An animal model of posttraumatic stress disorder: The use of cut-off behavioral criteria. *Ann N Y AcadSci.* 2004. V. 1032. P. 167–178.
6. *Tselikman V., Dremencov E., Maslennikova E., et al.* Post-Traumatic Stress Disorder Chronification via Monoaminooxidase and Cortisol Metabolism. *Horm-Metab Res.* 2019. V. 51. № 9. P. 618–622.
7. *Voznessenskaya V.V., Kyuchnikova M.A., Wysocki C.J.* Roles of the main olfactory and vomeronasal systems in detection of androstenone in inbred strains of mice // *Current Zool.* 2010. V. 56. № 6. P. 813–818.
8. *Вознесенская В.В.* Использование химических сигналов хищника для разработки альтернативных подходов к регуляции численности грызунов. *Международный журнал экспериментального об-разования.* 2015. № 2–1. С. 80–82.
9. *Apfelbach R., Parsons M.H., Soini H.A., et al.* Are single odorous components of a predator sufficient to elicit defensive behaviors in prey species? *Front Neurosci.* 2015. V. 29. № 9. P. 263.
10. *Cohen H., Tianmin L., Kozlovsky N., et al.* The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of posttraumatic stress disorder // *Neuropsychopharmacol.* 2011. V. 37. № 2. P. 350–363.
11. *Волков В.П.* Функциональная морфология коры надпочечников в возрастном аспекте // *Современная медицина: актуальные вопросы.* 2014. № 31. С. 16–26.
12. *Wang Q., Yu K., Wang J., et al.* Predator stress-induced persistent emotional arousal is associated with alterations of plasma corticosterone and hippocampal ste-

- roid receptors in rat // *Behav. Brain Res.* 2012. V. 230. № 1. P. 167–174.
13. *Komelkova M., Manukhina E., Downey H.F. et al.* Hexobarbital Sleep Test for Predicting the Susceptibility or Resistance to Experimental Posttraumatic Stress Disorder. // *Int J Mol Sci.* 2020. V. 21. № 16. P. 5900.
14. *Karlović D., Serretti A., Marčinko D., et al.* Serum testosterone concentration in combat-related chronic posttraumatic stress disorder // *Neuropsychobiol.* 2012. V. 65. № 2. P. 90–95.
15. *Kiraly D.D., Sher L.* Low testosterone in a young combat veteran with dual diagnosis and suicidal behavior: A case study // *Int J Adolesc Med Health.* 2015. V. 27. № 2. P. 235–237.
16. *Taylor M.K., Kviatkovsky S.A., Hernández L.M., et al.* Anabolic hormone profiles in elite military men // *Steroids.* 2016. V. 110. P. 41–48.
17. *Goodale T., Sadhu A., Petak S., et al.* Testosterone and the Heart // *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2017. V. 13. № 2. P. 68–72.
18. *Mitani F., Suzuki H., Hata J., et al.* A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role // *Endocrinol.* 1994. V. 135. № 1. P. 431–438.
19. *Mitani F.* Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2014. V. 90. № 5. P. 163.

## NEW MORPHOFUNCTIONAL CRITERIA FOR PROFILE RESISTANCE IN MODELING POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER AS ADRENAL DYSFUNCTION TRIGGER

**M. V. Kondashevskaya<sup>a, #</sup>, M. V. Komelkova<sup>b</sup>, V. E. Tseylikman<sup>b</sup>, O. B. Tseylikman<sup>b, c</sup>, K. A. Artem'yeva<sup>a</sup>,  
V. V. Aleksankina<sup>a</sup>, M. N. Boltovskaya<sup>a</sup>, A. P. Sarapultsev<sup>c, d</sup>, P. N. Popkov<sup>e</sup>,  
M. V. Cheresheva<sup>c</sup>, and Academician of the RAS V. A. Chereshev<sup>c, d</sup>**

<sup>a</sup> *A. P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia*

<sup>b</sup> *South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

<sup>d</sup> *Institute of Immunology and Physiology of UB RAS, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>e</sup> *South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: marivladiko@mail.ru*

For the first time in posttraumatic stress disorder (PTSD) modelling studies, we describe the morphofunctional state of adrenal glands in Wistar rats resistant and sensitive to predator stress. Despite there were evident signs of adrenal dysfunction in both phenotypes, in resistant animals we discovered the thickening of the intermedia zone and high indexes of functional activity of stem cells which is a sign of ample adaptation process. The most important data are those suggesting a direct relationship between corticosterone and testosterone levels reduction and adrenal dysfunction in PTSR models. The obtained data allow viewing adrenal stem cells as potential targets for therapeutic intervention.

**Keywords:** Wistar rats, post-traumatic stress disorder, morphofunctional characteristics of the adrenal glands, adrenal stem cells, stress resistance

УДК 575.22:595.773.4

## ГЕН *PIRAGUA* НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ВАЖНЫМ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ

© 2021 г. В. В. Соколов<sup>1,\*</sup>, академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, О. В. Кырчанова<sup>1</sup>

Поступило 30.07.2021 г.  
После доработки 03.09.2021 г.  
Принято к публикации 03.09.2021 г.

Белки с кластерами доменов цинковых пальцев  $C_2H_2$ -типа ( $C_2H_2$ -белки) являются наиболее обширным классом транскрипционных факторов высших эукариот. На N-конце большой группы  $C_2H_2$ -белков членистоногих были найдены домены ZAD (zinc finger-associated domain), основной функцией которых является формирование гомодимеров. Одним из таких белков является белок Fu2, кодируемый геном *piragua*. С помощью метода CRISPR/Cas9 была получена делеция гена, не имеющая фенотипического проявления. С помощью фC31-зависимой *attP/attB* сайт-специфической интеграции была получена трансгенная линия, экспрессирующая белок Fu2 с HA эпитопом, что позволит в дальнейшем провести детальное исследование распределения сайтов связывания и функций белка.

**Ключевые слова:** ZAD-домен, цинковые пальцы  $C_2H_2$ , архитектурные белки, регуляция транскрипции  
**DOI:** 10.31857/S2686738921060147

ДНК-связывающие белки с кластерами доменов цинковые пальцы типа Cys2His2 (ZF- $C_2H_2$ ) являются самой распространенной группой транскрипционных факторов у высших эукариот [1]. К этой группе относится хорошо описанный  $C_2H_2$ -белок млекопитающих, CTCF, который выполняет ключевую роль в формировании архитектуры хромосом [2]. У дрозофилы был описан его гомолог, dCTCF, а также ряд других  $C_2H_2$ -белков, названных архитектурными, которые участвуют в формировании регуляторных элементов, и могут поддерживать специфичные дистанционные взаимодействия между ними [2, 3]. Обычно для специфичного связывания с мотивами из 12–15 пн архитектурные белки используют 4–5 ZF- $C_2H_2$  [2]. У членистоногих значительная часть  $C_2H_2$ -белков содержит на N-конце ZAD-домен, который обеспечивает гомодимеризацию [4, 5]. Белки с ZAD-доменами составляют примерно одну треть от общего числа  $C_2H_2$ -белков и одну десятую часть от всех ТФ в геноме *D. melanogaster* [6]. К настоящему моменту изучены функции только небольшой части белков ZAD- $C_2H_2$ , большинство из которых экспрессируются в процессе оогенеза и в раннем эмбриогенезе [4].

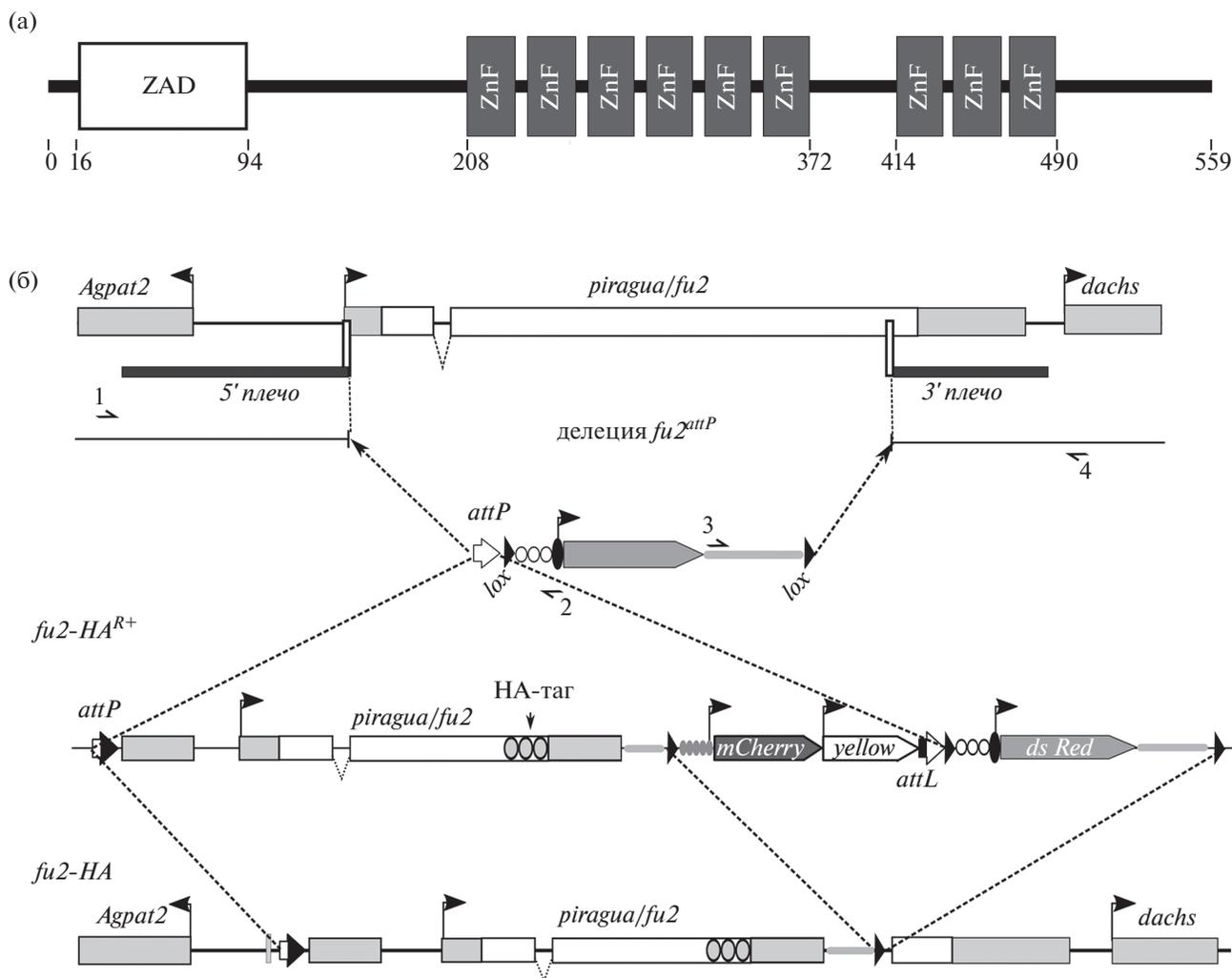
Ген *piragua* (другое название *fu2*, CG9233) кодирует ДНК-связывающий транскрипционный фактор Fu2, который содержит N-концевой ZAD-домен и два кластера доменов из 6 и 3 ZF- $C_2H_2$ , разделенных 40 аминокислотами [7] (рис. 1а).

По структуре Fu2 можно отнести к классу архитектурных белков. Ранее с помощью мутагеназа, опосредованного мобилизацией Р-элемента, были получены мутации *piragua*, которые значительно снижали количество белка Fu2 и приводили к летальности на разных стадиях развития от эмбриогенеза до 1–2 стадии личинки [7]. Был сделан вывод, что Fu2 нужен в процессе формирования имагинальных дисков и кутикулы. Данные, полученные методом РНК-интерференции [8], указывают на роль данного белка в клеточной конкуренции, опосредованной *flower*. РНК-интерференция под контролем драйвера *pnr* приводила к нехватке щетинок, дефектам пигментации и куколочной смерти [9].

Основной целью настоящего исследования является делеция гена *piragua*, что позволит исследовать роль белка Fu2 *in vivo* и тагировать (т.е., получить линию мух, экспрессирующую белок, слитый с удобным для исследователя эпитопом) Fu2 для картирования его сайтов связывания. С этой целью был использован подход, который включает удаление гена *piragua* с заменой его на сайт *attP* с помощью системы CRISPR/Cas9 [11] и последующей фC31-зависимой *attP/attB* сайт-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

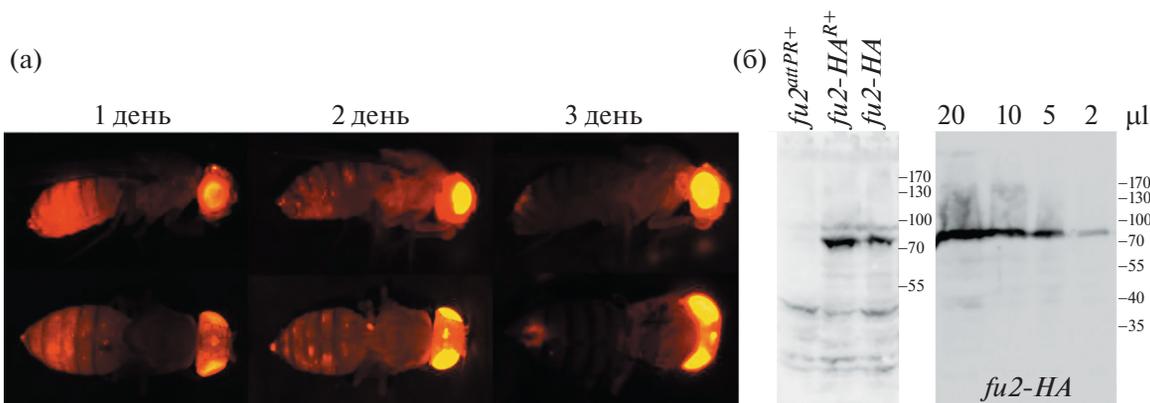
\*e-mail: vladimir.sokolov.v.93@gmail.com



**Рис. 1.** Стратегия замены гена *piragua* на его тагированную копию. (а) Структура белка Fu2. ZAD-домен обозначен белым прямоугольником, цинковые пальцы типа  $C_2H_2$  (ZF) обозначены черными прямоугольниками. Цифрами обозначены координаты доменов в аминокислотах. (б) Схема геномного локуса *piragua* и получения линий *fu2<sup>attPR+</sup>* и *fu2-HA*. Кодированные участки гена *piragua* обозначены белыми прямоугольниками, серыми прямоугольниками отмечены некодирующие участки генов. Черными флажками обозначены промоторы генов. Узкими вертикальными белыми прямоугольниками отмечены CRISPR-мишени. Черными горизонтальными прямоугольниками обозначены фрагменты, использованные в качестве плеч для гомологичной рекомбинации. Черным овалом обозначен промотор *hsp70*. Три белых кружка обозначают сайты связывания рахб. Белой, серой и темно-серой пятиугольной стрелкой обозначены соответственно маркерные гены *yellow*, *dsRed* и *mCherry*. Серой горизонтальной полоской обозначен терминатор SV40. Черными треугольниками обозначены *lox*-сайты. Белой горизонтальной стрелкой обозначен *attP*-сайт, комбинации белой и черной стрелок соответствуют рекомбинантным *attP/attB*. Серыми кружками обозначен промотор *glass*. Серыми кружками с черным контуром обозначен HA-таг. Черными полустрелками обозначены праймеры, использованные для проверки делеции: 1 – Fu2GRdir, 2 – H70rev, 3 – Sv40RT, 4 – Fu2GRr.

специфической интеграцией тагированной копии гена [12]. Гидовые РНК были выбраны с использованием “CRISPR optimal target finder” [12] таким образом, чтобы удалить последовательности всего гена, не затрагивая регуляторные области окружающих генов: 5' *tcgactatcgtgtagat* – 2 пн от точки старта транскрипции гена *piragua*, и 3' *ctgccgagggacgcactagc* – в 94 пн (32 кодонах) ниже стоп-кодона (рис. 16). Гидовые последовательности клонировали в плазмиду *pCFD4-*

*U6:1\_U6:3tandemgRNAs* plasmid (Addgene # 49411). В качестве основы для клонирования плазмиды-донора использовали вектор *pHD-DsRed*, полученный от К. О’Connor-Giles (Addgene no. 51434). Данный вектор содержит сайт *attP* и репортерный ген *dsRed*, фланкированный *lox*-сайтами. *dsRed*, кодирующий красный флуоресцентный белок, находится под минимальным промотором *hsp70*, усиленным тремя сайтами связывания белка рахб, который активирует промотор в глазах. По-



**Рис. 2.** (а) Флуоресценция мух линии *fu2<sup>antPR+</sup>*. У молодых мух наблюдается интенсивная флуоресценция в 4 и следующих брюшных сегментах. Со временем она угасает, и остается слабая флуоресценция участка в 6–7 сегменте брюшка. Снимки получены на микроскопе Leica. (б) Экспрессия тагированного белка Fu2-НА. Слева показан вестерн-блот белковых экстрактов, выделенных из мух линий *fu2<sup>antPR+</sup>*, *fu2-HA<sup>R+</sup>*, *fu2-HA*, справа – вестерн-блот белкового экстракта, выделенного из эмбрионов линии *fu2-HA*.

сле репортерного гена расположен терминатор SV40. В вектор были клонированы плечи для гомологической рекомбинации, которые амплифицировались путем ПЦР с геномной ДНК линии 58492 (Bloomington Drosophila Stock Center) с использованием следующих праймеров: Fu2 5'dir aagagctcgcagcatctgcagtgcgaataaa – Fu2 5'rev cacgatatgatcgcgatgtcgc (734 п.н. фрагмент), и Fu2 3'dir aactcggaggaactgtcgttctacagcaac – Fu2 3'rev aaggccctctctcgtatcggacaacgt (500 п.н. фрагмент) (рис. 16).

Плазмиду для рекомбинации вместе с плазмидой, экспрессирующей гидовые РНК, инъецировали в эмбрионы линии 58492 из Bloomington Drosophila Stock Center. Развившихся мух скрещивали с линией *y<sup>1</sup>w<sup>1</sup>*; *CyO/If*. В потомстве были отобраны мухи по флуоресценции *dsRed* в глазах, их скрещивали с линией *y<sup>1</sup>w<sup>1</sup>*; *CyO/If*. В результате была получена линия с делецией размером 1770 пн, имеющей координаты: 2L:8464499..8466269 (6.40). Всего была получена 1 линия с сигналом *dsRed*. Полученную делецию, *fu2<sup>antPR+</sup>*, проверяли методом ПЦР с праймеров Fu2GRdir (ctgcgtaggcgtaacagttg) – H70rev (cgctgtttatttgccttagc), и Fu2GRr (cgtacggggcgaactcaa) – sv40RT\_2 (agccataccacattgtagag) (рис. 16). Делеция гена не влияет на пигментацию кутикулы, расположение и размер щетинок и волосков, форму тергитов и стернитов, размер и строение глаз и крыльев, фертильность и жизнеспособность самцов и самок. Это противоречит фенотипу мутации, полученной путем мобилизации транспозонов [7], а также результатам, наблюдавшимся при РНК-интерференции под драйвером *pnr* [9]. Мы полагаем, что наблюдавшиеся авторами этих статей фенотипы являются артефактами использованных ими методов.

Так как экспрессия *dsRed* в полученной линии находится под контролем регуляторных элементов *piragua*, то сигнал *dsRed* должен отражать локализацию экспрессии *piragua* в организме. Ока-

залось, что репортер помимо глаз преимущественно активируется в задних брюшных сегментах (A2–A6), причем экспрессия затухает у взрослых мух в течение 3 дней (рис. 2а).

Для тагирования Fu2 геномная область кодирующей части гена *piragua* была амплифицирована с праймеров Fu2 5'f Nhe tgtgctagctagggataacagggtaaataggcctgcagtgcgaataaattccactaaac – Fu2 5'g Xho aaactcgcagctcgggacgagtctcgcgtgtag – для поднятия фрагмента, включающего промоторную и всю кодирующую область, и Fu2 3'Ud ggtctagaacaacattatcatcgttataaag – Fu2 3'Ur gtgcggccgctgttgctcgcagcactgsc – для поднятия 3'UTR. В рамку считывания гена *piragua* на 3'-конец перед 3'UTR был клонирован НА-таг. Для интеграции в геном полученной тагированной копии гена использовали описанный ранее вектор *attB-glass-mCherry-mini-yellow* [13]. Полученная плаزمида была инъецирована в эмбрионы линии *fu2<sup>antPR+</sup>* вместе со вспомогательной плазмидой, экспрессирующей интегразу φC31 [12]. Неожиданно оказалось, что репортер *mini-yellow* в геномном районе *piragua* не экспрессируется. Вследствие этого успешные интеграции отбирали на основе экспрессии репортера *mCherry* в глазах.

Успешность интеграции подтверждали ПЦР. Было отобрано 4 линии, *fu2-HA<sup>R+</sup>*. С помощью Cre-опосредованной рекомбинации по *lox*-сайтам все репортерные гены были удалены и получена линия *fu2-HA* (рис. 1б). Для подтверждения экспрессии тагированного белка были произведены вестерн-блоты с антителами к НА-тагу с лизатом из взрослых самок и из эмбрионов линии *fu2-HA* (рис. 2б). Белок преимущественно присутствует в эмбрионах, что соответствует доступным данным относительно экспрессии гена *piragua* [FlyBase, modENCODE Development RNA-Seq].

Таким образом, получена делеция гена *piragua*, *fu2<sup>attPR+</sup>*, которая не имеет мутантного фенотипа. Эти результаты предполагают, что функции белка Fu2 компенсируются другими архитектурными белками. Экспрессия *dsRed* в линии *fu2<sup>attPR+</sup>* в задних брюшных сегментах молодых мух может указывать на сегмент-специфичную экспрессию данного белка и предполагает его функционирование в процессе формирования задних брюшных сегментов дрозофилы. Полученная платформа *fu2<sup>attPR+</sup>* может быть использована в дальнейшем для изучения свойств белка Fu2 и его отдельных доменов. В настоящей работе была получена трансгенная линия, которая экспрессирует Fu2-НА, что позволит исследовать распределение сайтов связывания белка в эмбрионах дрозофилы и определить мотив, с которым связывается белок.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-74-30026.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федотова А.А., Бончук А.Н., Могилла В.А., и др. Белки с цинковыми пальцами типа C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> – самый многочисленный и наименее изученный класс транскрипционных факторов высших эукариот // *Acta Naturae*. 2017. Т. 9. № 2 (33). С. 50–61.
2. Maksimenko O.G., Fursenko D.V., Belova E.V. et al. CTCF As an Example of DNA-Binding Transcription Factors Containing Clusters of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Type Zinc Fingers // *Acta Naturae*. 2021. V. 13. № 1. P. 31–46.
3. Kyrchanova O., Georgiev P. Mechanisms of Enhancer-Promoter Interactions in Higher Eukaryotes // *Int. J. Mol Sci*. 2021. V. 22. № 2. С. 671.
4. Chung H.R., Lohr U., Jackle H. Lineage-specific expansion of the zinc finger associated domain ZAD // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 9. P. 1934–1943.
5. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., et al. Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila*. // *Nucleic Acids Res* 2021. V. 49. № 4. P. 2375–2389.
6. Chung H.R., Schafer U., Jackle H., et al. Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger genes in *Drosophila* // *EMBO Repts*. 2002. V. 3. № 12. P. 1158–1162.
7. Nazario-Yepiz N.O., Riesgo-Escovar J.R. *piragua* encodes a zinc finger protein required for development in *Drosophila* // *Mechanisms of Development*. 2017. V. 144. № Pt B. P. 171–181.
8. Rhiner C., López-Gay J.M., Soldini D. et al. Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila* // *Developmental Cell*. 2010. V. 18. P. 985–998.
9. Mummery-Widmer J.L., Yamazaki M., Stoeger T., et al. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi // *Nature*. 2009. V. 458. № 7241. P. 987–992.
10. Zhang X., Koolhaas W.H., Schnorrer F. A versatile two-step CRISPR- and RMCE-based strategy for efficient genome engineering in *Drosophila* // *G3 (Bethesda)*. 2014. V. 4. № 12. P. 2409–2418.
11. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., et al. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific  $\phi$ C31 integrases // *PNAS*. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
12. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D. et al., Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* // *Genetics*. 2014. V. 196. № 4. P. 961–971.
13. Postika N., Schedl P., Georgiev P., et al. Mapping of functional elements of the Fab-6 boundary involved in the regulation of the Abd-B hox gene in *Drosophila melanogaster* // *Scientific Reports*. 2021. V. 11. № 1. P. 4156.

## ***PIRAGUA* GENE IS NOT ESSENTIAL FOR *DROSOPHILA* DEVELOPMENT**

V. V. Sokolov<sup>a,#</sup>, academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>a</sup>, and O. V. Kyrchanova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: vladimir.sokolov.v.93@gmail.com*

Proteins with clusters of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger domains (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-proteins) constitute the most abundant class of transcription factors in higher eukaryotes. N-terminal ZAD (zinc finger-associated domain) dimerization domain has been identified in a large group of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-proteins mostly in insects. *piragua* gene encodes one of these proteins, Fu2. We have generated CRISPR/Cas9-mediated deletion of the *piragua* gene that has no phenotype. We have used  $\phi$ C31-mediated *attP/attB* recombination to generate a transgenic line expressing Fu2 protein fused with HA epitope. This line will be useful for analysis of DNA binding profile and functions of Fu2 protein.

**Keywords:** ZAD-domain, CYS2-HIS2 Zinc Fingers, architectural proteins, regulation of transcription

УДК 639.211:639.3.07:546.3(-0.32.25)(-032.26)(268.46)

## АКТИВНОСТЬ $Na^+/K^+$ -АТФАЗЫ У СМОЛТОВ ГОРБУШИ *ONCORHYNCHUS GORBUSCHA* (WALBAUM, 1792) БАСЕЙНА БЕЛОГО МОРЯ ПРИ СОДЕРЖАНИИ В САДКАХ С ПРЕСНОЙ, ЭСТУАРНОЙ И МОРСКОЙ ВОДОЙ

© 2021 г. Е. И. Кяйвяряйнен<sup>1</sup>, Н. Л. Рендаков<sup>1,\*</sup>,  
Д. А. Ефремов<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН Н. Н. Немова<sup>1</sup>

Поступило 10.08.2021 г.  
После доработки 30.08.2021 г.  
Принято к публикации 30.08.2021 г.

В 10-дневном садковом эксперименте с пресной, эстуарной и морской водой получены данные об изменении активности  $Na^+/K^+$ -АТФазы (НКА) у сеголеток горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (интродуцированного в 1959 г. в реки Кольского полуострова вида лососевых рыб), отловленных во время покатной миграции в р. Индера бассейна Белого моря. Развитие устойчивости к повышенной солености среды у смолтов горбуши сопровождается активацией НКА. Так, в эстуарной воде с колебаниями солености (от пресной до морской) и в морской среде (28 ‰) активность НКА у мальков горбуши была достоверно выше, чем у особей, содержащихся в садках с пресной водой. Полученные результаты, характеризующие гипоосморегуляторную способность мальков горбуши, указывают на то, что становление смолтификации у этого вида рыб наблюдается в раннем онтогенезе. Результаты изменения активности НКА свидетельствуют о готовности мигрирующих мальков горбуши к морской фазе жизненного цикла.

**Ключевые слова:** осморегуляция, смолтификация,  $Na^+/K^+$ -АТФаза, соленость среды, горбуша

**DOI:** 10.31857/S268673892106007X

### ВВЕДЕНИЕ

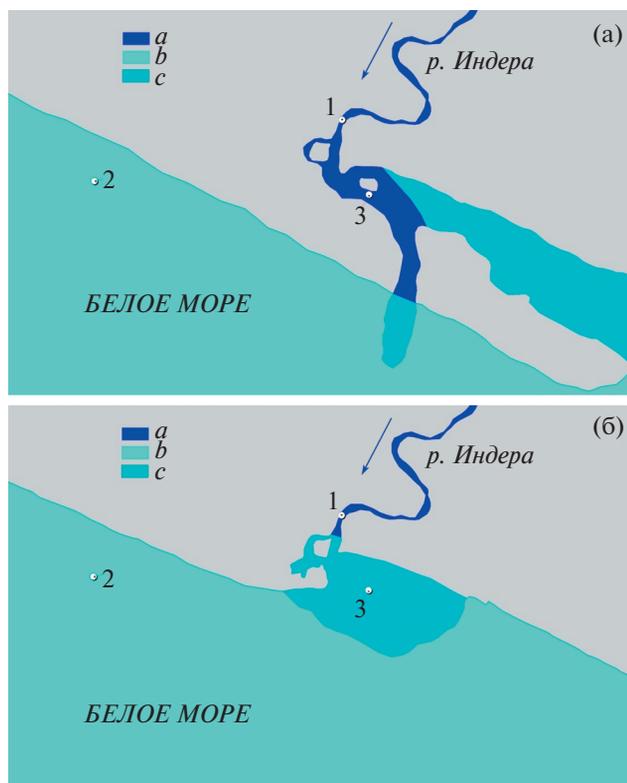
Жизненный цикл лососевых рыб начинается в пресной воде, причем у анадромных форм молодь рыб совершает покатную миграцию в морскую среду, проходя стадию смолтификации. Смолтификация – генетически запрограммированный процесс, в ходе которого молодь лососевых рыб, обитая еще в пресной воде, физиологически готовится к переходу в морскую среду, что предотвращает нарушения ионного обмена при жизни в гиперосмотической среде [1]. При этом у рыб происходят заметные поведенческие, морфологические и биохимические изменения. У различных представителей тихоокеанских лососей (род *Oncorhynchus*) смолтификация происходит в разном возрасте. Так, например, виды со сравнительно поздней смолтификацией, к которым относятся нерка (*O. nerka*), кижуч (*O. kisutch*) и ча-

выча (*O. tshawytscha*), после выклева могут провести в реке от одного года до нескольких лет и не совершают покатную миграцию, пока не достигнут размера 12–15 см [2]. У видов с ранней смолтификацией – у горбуши (*O. gorbuscha*) и кеты (*O. keta*) – личинки становятся устойчивыми к морской воде всего через несколько недель после вылупления [2], еще до полной резорбции желточного мешка [3], что позволяет им вскоре мигрировать в эстуарную зону. В отличие от лососевых с поздней смолтификацией покатная миграция у горбуши и кеты начинается при малых размерах (3–5 см) [2]. Мальки горбуши могут задерживаться в эстуариях, чтобы снизить степень осмотического стресса и обеспечить таким образом постепенность адаптации к морской среде. Скотившиеся в море мальки горбуши обычно проводят в прибрежной зоне от нескольких недель до месяца [4].

Эксперименты показывают, что из всех представителей семейства лососевых только молодь горбуши и кеты обладает устойчивостью к резким изменениям солености. Так, в исследованиях Вейсбарта (Weisbart) [5], в которых проводили резкое перемещение мальков пяти видов тихоокеанских лососей (*O. gorbuscha*, *O. keta*, *O. kisutch*,

<sup>1</sup> Институт биологии – обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Федерального исследовательского  
центра “Карельский научный центр Российской  
академии наук”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: nlrend@mail.ru



**Рис. 1.** Расположение экспериментальных садков в районе устья реки Индера. а – во время отлива, б – во время прилива.

Примечание: 1 – место отлова мальков и садок “река”; 2 – садок “море”; 3 – садок “эстуарий”; а – пресная вода; б – соленая вода; с – распресненная вода; серым цветом показана суша.

*O. tshawytscha*, *O. nerka*) из пресной в морскую воду (31.8 ‰), показано, что регуляция ионного состава крови у молоди горбуши и кеты осуществляется лучше по сравнению с молодью других представителей рода *Oncorhynchus*. Более того, после резорбции желточного мешка мальки горбуши и кеты уже не погибают при длительном выдерживании в морской воде, т.е. проявляют эвригалиность. Это может быть связано с тем, что горбуша и кета часто нерестятся в низовьях рек, недалеко от моря [5, 6]. Поскольку горбуша и кета проводят в морской воде большую часть своего жизненного цикла, эти виды считают наиболее “морскими” (“marine-like”) видами лососей [7]. Это находит отражение и в их крайнем положении на “шкале анадромии” [2].

Известно, что в жабрах эвригалинных рыб после перемещения из пресной воды в морскую адаптивно увеличивается активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (НКА), фермента, участвующего в процессах осморегуляции [8]. В жабрах рыб НКА локализуется в основном в базолатеральных мембранах ионоцитов и состоит из субъединиц, по-

разному реагирующих на осмотические изменения и акклимацию к солености [9, 10]. Так, субъединица  $\alpha 1a$  НКА лососевых преимущественно экспрессируется в пресной воде, а  $\alpha 1b$  – в морской [9, 11]. Подготовительная адаптация, приводящая к повышению устойчивости мигрирующих рыб к соленой воде, контролируется генетически [12]. В связи с этим повышение активности НКА в жабрах смолтов лососевых рыб происходит сезонно и синхронно с миграцией [2, 3]. После миграции в морскую среду активность НКА увеличивается повторно, что соответствует второй фазе смолтификации [3, 13].

Осморегуляторная роль НКА у разных видов рыб была в основном изучена у взрослых особей, тогда как в нашей работе рассматривается значение этого фермента при адаптации к эстуарной и морской воде бассейна Белого моря у мальков горбуши. Следует отметить, что исследования, проведенные на данном объекте, немногочисленны и выполнены в искусственных условиях выращивания [14]. В данной работе проведено сравнительное исследование изменения уровня активности НКА у совершающих покатную миграцию мальков (смолтов) горбуши при выдерживании в садках с пресной, эстуарной и морской водой (в условиях Белого моря). Кроме того, изучена устойчивость мальков горбуши к воздействию соленой воды в течение относительно длительного времени (10 сут).

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В середине июня 2019 г. в реке Индера (бассейн Белого моря) малой ловушкой мережного типа было отловлено 100 мальков горбуши (рис. 1). Эксперимент был проведен с мальками, имевшими серебристую окраску, без остатков желточного мешка, собранными во время покатной миграции. Мальки были разделены на 4 группы, по 25 особей в каждой.

Особи первой (исходной) группы были сразу зафиксированы в жидком азоте.

Рыбы второй группы были помещены в русловой садок в пресной воде (садок “река”), который был на 60% погружен в воду (скорость течения – 0.3–0.4 м/с) при температуре 8.8°C. Этот садок был расположен рядом с местом отлова мальков.

Третью группу мальков в начале эксперимента поместили в садок, расположенный в эстуарии (садок “эстуарий”). Садок был погружен в воду на расстоянии 0.4–0.5 м от дна. В зависимости от направления ветра и локального течения вода в садке была или соленая, или распресненная. Цикл приливов и отливов имел околосуточную периодичность, при этом во время полного прилива садок находился в соленой воде (дважды в сутки), а во время полного отлива – в распресненной (то-

**Таблица 1.** Длина и масса мальков горбуши в садковом эксперименте

Группы	<i>t</i> воды в день взятия материала, °С	TL, см	<i>m</i> , г
Исходная	8.8	3.35 ± 0.06	0.17 ± 0.01
Садок “река”	14.5	3.53 ± 0.03	0.16 ± 0.01
Садок “эстуарий”	18.1	3.51 ± 0.05	0.19 ± 0.01
Садок “море”	11.5	3.41 ± 0.02	0.17 ± 0.01

же дважды в сутки). Во время прилива вода становилась холоднее, а во время отлива — теплее (амплитуда до 10°С), так как пресная вода прогревалась быстрее, а соленая — медленнее. Особи горбуши третьей группы были извлечены из садка во время отлива. При отливе садок находился в потоке пресной воды (скорость потока 0.3–0.4 м/с), погруженный в нее на 50%. Температура воды при размещении садка в воде — 8.8°С.

Четвертую группу мальков поместили в морской садок (садок “море”) с соленостью воды 28‰ (постоянная) и с температурой 3.9°С. Мальков предварительно выдерживали 1 ч в смеси пресной и морской воды (1:1) и еще 1 ч — в 100%-й морской воде. Это было сделано, чтобы имитировать естественный, плавный переход в морскую воду и тем самым облегчить адаптацию. Кроме того, содержание в первые 2 ч под наблюдением в гиперосмотической среде требовалось, чтобы проверить, не будет ли при этом немедленной гибели мальков. Морской садок находился на расстоянии 400 м от берега, где глубина моря достигала 4–5 м, на расстоянии 1 м от дна, на растяжках. Во время приливов и отливов садок был полностью погружен в воду. Температура воды, которая наблюдалась во время отбора мальков в каждой из групп, указана в таблице.

Садки имели кубическую форму, их размеры составляли 0.5 × 0.5 × 0.5 м<sup>3</sup>. Устройство садка: на каркас из нержавеющей прутьев натянута сеть “дель хамсарос” с размером ячеи 5 мм. Для запуска и выпуска рыбы на одной из граней садка имеется рукав диаметром 10 см, снабженный синтетическим шнуром для затягивания. К четырем вершинам одной из граней садка прикреплены 4 шнура длиной по 2 м. К концам шнуров в качестве груза были привязаны камни.

Время содержания в садках для второй, третьей и четвертой групп составило около 10 дней (226 ч). Гибели мальков в ходе эксперимента не наблюдали. Все мальки были зафиксированы в жидком азоте (в первой группе — сразу, в остальных — по окончании эксперимента), а затем хранились в лаборатории при –80°С до начала биохимического анализа.

После разморозки особей перед началом проведения биохимических исследований производили их измерение и взвешивание. Размерно-ве-

совые характеристики исследованных рыб представлены в табл. 1.

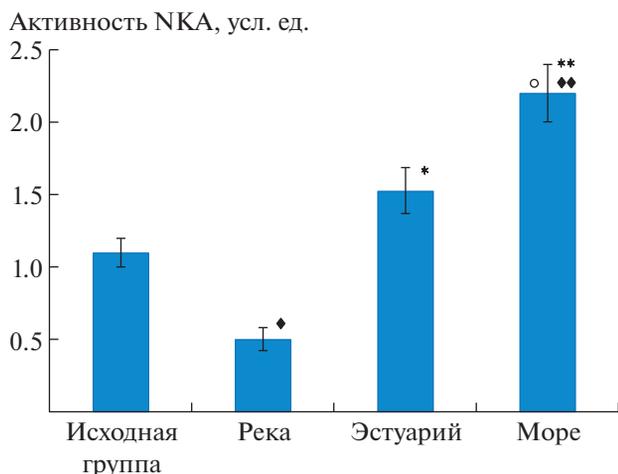
Активность Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы (КФ 3.6.1.3) определяли согласно методике [15]. В нашем эксперименте были исследованы цельные особи мальков, которые характеризовались сравнительно небольшой массой тела (<0.2 г.), резорбированным желточным мешком и жабрами. Ионно- и осморегуляция у взрослых рыб осуществляется у жабрах, почках и кишечнике, при этом у взрослых рыб — в основном в жабрах, которые непосредственно контактируют с внешней средой и обеспечивают большую часть трансэпителиального ионного обмена [16]. Окончательная дифференцировка жабр горбуши происходит в раннем онтогенезе между выклевом и завершением резорбции желточного мешка [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования были проведены в естественных условиях без моделирования конкретных показателей, таких как температура и соленость, влияющих на активность НКА. Активность данного фермента у мальков горбуши, отобранных из разных садков, возрастает в соответствии с ростом солености воды в ряду “река” → “эстуарий” → “море” (рис. 2). В ходе эксперимента в различных садках температура по-разному изменялась относительно исходного значения 8.8°С (табл. 1).

После выдерживания в течение 10 сут в садке “река” активность НКА у мальков горбуши была вдвое ниже, чем у рыб в исходной группе, отловленных из реки Индера. В садке “эстуарий” отмечены значительные периодические колебания как температуры (от 8.8°С до 18.1°С), так и солености воды (от морской до пресной). Содержание мальков в садке “эстуарий” привело к увеличению активности НКА в 3 раза по сравнению с таковой в садке “река” и в 1.4 раза по сравнению с исходной группой.

Выдерживание горбуши в садке “море” привело к еще более значительному увеличению активности НКА, при этом данный показатель увеличился в 2 раза по сравнению с исходными данными, более чем в 4 раза по сравнению с таковым у смолтов, содержащихся в садке “река”, и в



**Рис. 2.** Активность НКА у смолтов горбуши в садковом эксперименте. Время экспозиции в отдельных садках – 10 сут. Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. ♦ –  $p < 0.05$  при сравнении с исходной группой, ♦♦ –  $p < 0.01$  при сравнении с исходной группой, \* –  $p < 0.05$  при сравнении с группой садок “река”, \*\* –  $p < 0.01$  при сравнении с группой садок “река”, ○ –  $p < 0.05$  при сравнении с группой садок “эстуарий”.

1.5 раза по сравнению с уровнем активности НКА у смолтов из садка “эстуарий”.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее на личинках горбуши из нативных популяций Северной Америки было показано, что при завершении резорбции желточного мешка сеголетки-личинки горбуши становятся смолтами [3, 14]. Такие сопутствующие признаки, как отсутствие желточного мешка, приобретение серебристой окраски, а также достижение размера 3 см позволяют предполагать, что исследованные нами личинки горбуши являются смолтами.

В дикой природе одними из важнейших факторов, определяющих рост и развитие смолтов, являются соленость и температура внешней среды. Изменение активности НКА в обсуждаемом эксперименте, по-видимому, обусловлено обоими указанными факторами. Активность НКА в жабрах обычно увеличивается после акклимации к низкой температуре [12]. Именно этим может объясняться снижение активности НКА по сравнению с исходными данными у смолтов горбуши через 10 сут после выдерживания в садке “река” в условиях увеличения температуры и неизменной солености. Стимулируемое холодом усиление активности НКА в осморегуляторных тканях может быть полезным для поддержания эффективной осморегуляции в термодинамически неблагоприятных условиях [17]. Влияние солености и температуры на активность НКА является разнона-

правленным, и в комбинации экологических факторов “соленость–температура” в условиях дикой природы более сильное воздействие, по-видимому, оказывает соленость (рис. 2).

Обнаруженное в эксперименте повышение НКА у смолтов горбуши, отобранных в р. Индера и содержавшихся в садках с морской водой с соленостью 28 ‰ в течение 10 сут, вероятно, связано с тем, что в организме мальков происходит вторичное (в отличие от первичного, которое происходит еще в пресной воде после выхода рыб из гравийных нерестовых гнезд) увеличение активности НКА, соответствующее второй фазе смолтификации [3, 13]. Подобное повышение НКА в жабрах горбуши из тихоокеанского бассейна Канады наблюдали во время второй фазы адаптации смолтов к морской среде [13], при этом пик активности фермента был отмечен через 8 нед после переноса в морскую среду. У других эвригалинных рыб активность НКА также в большинстве случаев адаптивно увеличивается при повышении солености окружающей среды [8]. Уровень активности НКА у молоди лососевых может быть связан с дифференциальной экспрессией изоформ НКА [2]. Ранее было показано, что в морской воде у личинок горбуши с резорбированным желточным мешком активность НКА в жабрах повышалась в 1.5 раза, а соотношение экспрессии мРНК изоформ  $\alpha 1b/\alpha 1a$  (т.е. морской к пресноводной) увеличивалось в шесть раз [18]. Личинки горбуши, которые обычно скатываются в морскую воду во время выхода из гравийного гнезда и резорбции желточного мешка, адаптированы к обитанию в морской воде, однако непосредственное влияние морской воды приводит к усилению гипоосморегуляторной функции у смолтов горбуши [3, 13].

Полученные в нашем исследовании данные о повышении (по сравнению с особями из пресной и эстуарной воды) активности НКА у мальков горбуши, выдерживаемых в морской воде (рис. 2), согласуются с результатами, полученными в эксперименте на радужной форели [9], в котором было обнаружено увеличение активности НКА на 10-е сутки после переноса рыб в 80%-ную морскую воду, хотя после их переноса в разбавленную до 40% морскую воду изменений в активности фермента не наблюдали.

Разбавленная морская вода может обеспечить некоторую, хотя и не полную, защиту смолтов горбуши от сильного осмотического стресса в морской среде. Смолты горбуши могут использовать зону эстуария в устье реки, задерживаясь в ней, чтобы уменьшить осморегуляторную нагрузку в морской среде и тем самым предотвратить резкое изменение физиологического состояния. Кроме того, зона эстуария важна для смолтов как область кормодобывания, быстрого роста и за-

щиты от хищников [6]. В воде эстуария наблюдаются периодические колебания солености воды. Вследствие этого мальки горбуши, обитающие в данной среде, должны быть готовы как к увеличению солености воды (во время приливов), так и к ее снижению (во время отливов). Поэтому обнаруженные в исследовании промежуточные (между таковыми, характерными для морской и пресной воды) значения активности НКА у смолтов горбуши из эстуария отражают адаптивные изменения, направленные на сведение к минимуму осмотического воздействия высоких (“морских”) концентраций соли, что способствует благополучной миграции горбуши через эстуарий в море. Следует отметить, что в проведенных экспериментах по воздействию на смолтов горбуши воды различной солености (пресной, эстуарной, морской) гибели мальков не было отмечено, что также дает основание полагать, что они хорошо адаптированы к резким изменениям солености.

Таким образом, результаты исследования на мальках горбуши, интродуцированной в реки Кольского полуострова, а также данные, полученные другими авторами на горбуше из прибрежных вод западной Канады [3, 13], указывают на то, что устойчивость мальков горбуши в естественных условиях к изменению экологических факторов (солености и температуры) при переносе из пресной воды в эстуарную и морскую связана с изменением активности НКА, что обеспечивает эффективное поддержание водно-солевого обмена и 100%-ю выживаемость. Для сравнения следует заметить, например, что резкое перемещение в морскую воду пестряток-годовиков кумжи (вида с поздней смолтификацией) приводит к их гибели из-за осмотического стресса [2]. Можно полагать, что в комбинации экологических факторов “соленость-температура” в условиях дикой природы более сильное воздействие на активность НКА оказывает соленость. Данные об осморегуляторной адаптации с участием НКА у молоди горбуши в 10-суточном садковом эксперименте свидетельствуют о том, что смолтификация у нее наблюдается в раннем онтогенезе, при переходе в стадию мальков.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук” (ЦКП КарНЦ РАН).

Исследование финансировалось из средств государственного бюджета, выделенных по темам № 0218-2019-0076 и № 0218-2019-0081.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCormick S.D., Hansen L.P., Quinn T.P., et al. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1998. V. 55. № S1. P. 77–92.
2. McCormick S.D. Smolt physiology and endocrinology // Euryhaline fishes. Elsevier: Academic Press, 2013. P. 199–251.
3. Gallagher Z.S., Bystriansky J.S., Farrell A.P., et al. A novel pattern of smoltification in the most anadromous salmonid: pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Can. J. Fish. Aquat. Sci. / ed. Jonsson B. 2013. V. 70. № 3. P. 349–357.
4. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Омельченко В.Т. Популяционная генетика лососевых рыб. Москва: Наука, 1997. 288 с.
5. Weisbart M. Osmotic and ionic regulation in embryos, alevins, and fry of the five species of Pacific salmon // Can. J. Zool. 1968. V. 46. № 3. P. 385–397.
6. Thorpe J.E. Salmonid fishes and the estuarine environment // Estuaries. 1994. V. 17. № 1. P. 76–93.
7. Nelson J.S., Grande T.C., Wilson M.V.H. Fishes of the World. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2016. 707 p.
8. Judd S. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoform regulation in three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) during salinity acclimation // A Thesis Degree Master Sci. DePaul University, Chicago, Illinois, 2012. 91 p.
9. Richards J.G., Semple J.W., Bystriansky J.S., et al. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer // J. Exp. Biol. 2003. V. 206. Pt. 24. P. 4475–4486.
10. Madsen S.S., Küllerich P., Tipsmark C.K. Multiplicity of expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms in the gill of Atlantic salmon (*Salmo salar*): cellular localisation and absolute quantification in response to salinity change // J. Exp. Biol. 2009. V. 212. № 1. P. 78–88.
11. McCormick S.D., Regish A.M., Christensen A.K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon // J. Exp. Biol. 2009. V. 212. № 24. P. 3994–4001.
12. McCormick S.D. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function // Cell. Mol. Approaches to Fish Ion. Regul. San Diego: Academic Press, 1995. P. 285–315.
13. Grant A., Gardner M., Nendick L., et al. Growth and ionoregulatory ontogeny of wild and hatchery-raised juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // Can. J. Zool. 2009. V. 87. № 3. P. 221–228.
14. Sullivan C.V., Brewer S.D., Johnston G.P., et al. Plasma thyroid-hormone concentrations and gill (Na+K)-ATPase activities in postemergent pink salmon // Trans. Am. Fish. Soc. 1983. V. 112. № 6. P. 825–829.
15. Кяйвяряйнен Е.И., Немова Н.Н. Активность Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы в различных органах стерляди (*Acipenser stellatus*)

- penser ruthenus*) при изменении факторов среды // Труды КарНЦ РАН. 2019. № 6. С. 27.
16. Yan J.-J., Hwang P.-P. Novel discoveries in acid-base regulation and osmoregulation: A review of selected hormonal actions in zebrafish and medaka // Gen. Comp. Endocrinol. 2019. V. 277. P. 20–29.
17. Ventrella V., Pagliarani A., Pirini M., et al. Lipid composition and microsomal ATPase activities in gills and kidneys of warm- and cold-acclimated sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) // Fish Physiol. Biochem. 1993. V. 12. № 4. P. 293–304.
18. Sackville M., Wilson J.M., Farrell A.P., et al. Water balance trumps ion balance for early marine survival of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) // J. Comp. Physiol. B. 2012. V. 182. № 6. P. 781–792.

**$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ACTIVITY IN SMOLTS OF PINK SALMON  
*Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum, 1792) OF THE WHITE SEA BASIN  
WHEN KEPT IN FISH TRAPS WITH FRESH, ESTUARINE, AND SEA WATER**

**E. I. Kaivarainen<sup>a</sup>, N. L. Rendakov<sup>a,#</sup>, D. A. Efremov<sup>a</sup>, and Corresponding Member of the RAS N. N. Nemova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: nrend@mail.ru

In a 10-day trap experiment with fresh, estuarine, and seawater, data were obtained on changes in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) activity in underyearlings of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (a salmon species introduced in 1959 into the rivers of the Kola Peninsula) caught during downstream migration in the Indyora river of the White Sea basin. The development of tolerance to increased salinity in pink salmon smolts is accompanied by NKA activation. Thus, in estuarine water with salinity fluctuations (from fresh to sea water) and in the marine environment (28‰), the NKA activity in pink salmon underyearlings was significantly higher than in individuals kept in fish traps with fresh water. The results obtained, characterizing the hypoosmoregulatory ability of pink salmon fry, indicate that smoltification development in this fish species is observed in early ontogenesis. The results of changes in NKA activity indicate the readiness of migrating pink salmon fry for the marine phase of their life cycle.

**Keywords:** osmoregulation, smoltification,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, salinity, pink salmon

УДК 616.98:578.828-085.281.8-036.8-07:616.155.32

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИВИРОВАННЫХ CD4<sup>+</sup> Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НЕОТВЕТЧИКОВ НА ВЫСОКОАКТИВНУЮ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

© 2021 г. В. В. Власова<sup>1,\*</sup>, Е. В. Сайдакова<sup>1</sup>, Л. Б. Королевская<sup>1</sup>,  
Н. Г. Шмагель<sup>2</sup>, академик РАН В. А. Черешнев<sup>1,3</sup>, К. В. Шмагель<sup>1</sup>

Поступило 09.07.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принято к публикации 31.08.2021 г.

Термином иммунологические неответчики (ИН) обозначают группу ВИЧ-инфицированных пациентов, у которых снижение вирусной нагрузки под действием высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) не приводит к эффективной регенерации пула CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Известно, что слабое восстановление численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в организме ИН обусловлено непродуктивным делением клеток памяти. Исходя из того, что способность лимфоцитов к пролиферации во многом определяется активностью метаболических процессов, целью настоящей работы была оценка показателей митохондриального дыхания и гликолиза в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти у ИН. Обследованы две группы ВИЧ-инфицированных больных, получающих ВААРТ: иммунологические неответчики и пациенты с эффективным восстановлением иммунитета (иммунологические ответчики – ИО). В контрольную группу (К) вошли здоровые добровольцы. Установлено, что в двух группах ВИЧ-позитивных пациентов интенсивность гликолиза в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти снижена по сравнению с таковой в группе К. Активность митохондриального дыхания в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ИО на базальном уровне была сопоставима с показателями К, но после стимуляции не достигала значений неинфицированных доноров. В группе ИН интенсивность митохондриального дыхания в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти была наименьшей и статистически значимо отличалась от значений ИО и К как на базальном уровне, так и после стимуляции. Полученные данные демонстрируют, что у ИН низкая регенераторная способность активированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти может быть связана с метаболическими нарушениями в данных клетках.

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, высокоактивная антиретровирусная терапия, CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, метаболизм, гликолиз, митохондрии

**DOI:** 10.31857/S2686738921060160

Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) вызывает выраженное снижение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных больных

[1], что, как правило, сопровождается увеличением численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [2]. Однако у 10–30% пациентов подавление репликации ВИЧ не приводит к эффективной регенерации пула CD4<sup>+</sup> Т-клеток [3]. Такие субъекты – “иммунологические неответчики” (ИН) – имеют высокий риск развития как ассоциированных, так и не ассоциированных со СПИД заболеваний, и повышенный уровень смертности [4].

Слабый прирост численности CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ИН, в значительной мере, обусловлен низкой продуктивностью пролиферации клеток памяти [5], которые являются основным источником регенерации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов при лимфопении [6]. Известно, что способность клеток к делению в значительной степени зависит от активности их метаболических процессов, особенно гликолиза и митохондриального дыхания

<sup>1</sup> “Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук” – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

<sup>2</sup> Государственное казенное учреждение здравоохранения Пермского края “Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями”, Пермь, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com

[7]. Так, аэробный гликолиз служит основным источником субстратов, участвующих в биосинтезе липидов, аминокислот и нуклеотидов – строительных блоков для дочерних лимфоцитов [8]. В свою очередь, митохондрии обеспечивают пролиферирующие клетки энергией, промежуточными продуктами синтеза белков и жирных кислот, а также сигнальными молекулами [9, 10]. Известно, что нарушение гликолиза или митохондриального дыхания в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах приводит к остановке деления [11]. Ранее было показано, что в CD4<sup>+</sup> Т-клетках ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих ВААРТ, снижена интенсивность окислительного фосфорилирования [12]. При этом активность метаболических процессов в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти у больных с неэффективным восстановлением иммунитета никем ранее не изучалась. Целью данной работы была оценка показателей митохондриального дыхания и гликолиза в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Клинические группы.* План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). В исследование были включены ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие ВААРТ более двух лет (вирусная нагрузка <50 копий/мл): 1) иммунологические неответчики (ИН; CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты менее 350/мкл;  $n = 4$ ); 2) иммунологические ответчики (ИО; CD4<sup>+</sup> Т-клетки более 350/мкл;  $n = 4$ ). В контрольную группу (К) вошли 4 неинфицированных ВИЧ добровольца.

*Получение биоматериала.* Забор крови осуществлялся натощак из локтевой вены в пробирки типа “Vacutainer”, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Численность CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов крови оценивали с использованием коммерческого набора BD Simultest™ IMK-Lymphocyte (“BD Biosciences”, США) на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (“Beckman Coulter”, США). Уровень вирусной нагрузки ВИЧ устанавливали наборами “Versant HIV-1 RNA 3.0 assay b” на анализаторе Versant 440 (“Siemens”, Германия).

Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности Диаколла (1.077 г/мл, “Диаэм”, Россия). Образцы помещали в жидкий азот в среде, содержащей 90% эмбриональной телячьей сыворотки (“Biowest”, Франция) и 10% диметилсульфоксида (“Appli-Chem”, Германия). После разморозки клеток CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты памяти выделяли методом

магнитной сепарации с использованием коммерческого набора Memory CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (“Miltenyi Biotec”, Германия) согласно инструкции производителя.

*Анализ метаболических процессов.* Изолированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (“Agilent Technologies”, США), содержащей 10 мМ глюкозы (“Sigma”, США), 2 мМ глутамин (“Диа-М”, Россия) и 1 мМ пирувата натрия (“Sigma”, США) и вносили по  $3 \times 10^5$  клеток в лунки планшета (“Agilent Technologies”, США), предварительно обработанные поли-D-лизином (50 мкг/мл, “Sigma”, США). Планшет центрифугировали в течение 2 мин при 200 g для формирования монослоя клеток. Объем лунки доводили до 150 мкл средой, планшет инкубировали при +37°C в течение 60 мин. Активность митохондриального дыхания и гликолиза определяли с использованием анализатора Seahorse XFe96 (“Agilent Technologies”, США) по показателям скорости потребления кислорода (oxygen consumption rate (англ.) – OCR) и скорости ацидификации среды (extracellular acidification rate (англ.) – ECAR) соответственно. Измерения производили на базальном уровне и после 40 мин стимуляции фитогемагглютинином (ФГА, 15 мкг/мл, “Serva”, Германия). На финальном этапе к образцам вносили ротенон и антимицин А (0.5 мкМ; “Agilent Technologies”, США), ингибирующие комплексы I и III дыхательной цепи митохондрий, соответственно, что позволило исключить из анализа немитохондриальное потребление кислорода.

*Статистический анализ данных.* Данные представлены в виде медиан, интерквартильных размахов (25–75 перцентиль) и 10–90%-ных интервалов. Достоверность различий между группами устанавливали на основе U-критерия Манна–Уитни. Проведение статистических расчетов и построение графиков осуществляли с использованием программного обеспечения “Statistica 6”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и полу (табл. 1). Группы ВИЧ-инфицированных пациентов не отличались по длительности инфекции, продолжительности приема ВААРТ и вирусной нагрузке. Количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток в крови ИН было существенно снижено в сравнении с аналогичными показателями ИО и К ( $p < 0.01$ ).

Базальная скорость потребления кислорода CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти, полученными от ИН, была меньше, чем у ИО ( $p < 0.05$ ) и К ( $p < 0.001$ ; рис. 1a).

Кратковременная активация клеток ФГА приводила к увеличению показателя митохондриаль-

**Таблица 1.** Клинические характеристики ВИЧ-инфицированных и здоровых лиц

Характеристики	ИН, $n = 4$	ИО, $n = 4$	К, $n = 4$
Возраст (годы)	38.5* (33.3–44.5)	43.0 (37.0–52.0)	44.5 (28.0–58.8)
Женщины (%)	50	50	75
Длительность инфекции (годы)	5 (3–13)	6 (4–13)	–
Продолжительность ВААРТ (годы)	3.2 (2.3–12.9)	5.2 (3.1–6.2)	–
Вирусная нагрузка ВИЧ в крови (копии/мл)	<50**	<50	–
Численность CD4 <sup>+</sup> Т-клеток на момент исследования (мкл <sup>-1</sup> )	224 (193–272) $p_{\text{ИН-ИО}} < 0.01$ $p_{\text{ИН-К}} < 0.01$	814 (522–870)	847 (607–1112)

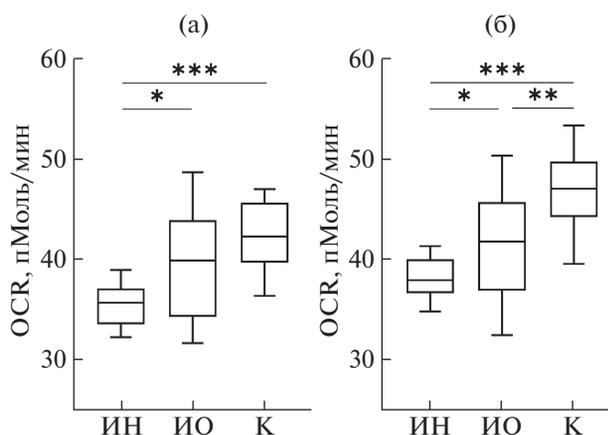
Примечание: \* – указаны медианы и интерквартильные размахи. ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль; ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия. \*\* – предел чувствительности тест-системы. Статистические расчеты выполнены по методу Манна–Уитни.

ного дыхания во всех исследуемых группах ( $p < 0.01$ ). Однако активированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных пациентов демонстрировали сниженный, в сравнении со здоровыми людьми, показатель OCR ( $p_{\text{ИН-К}} < 0.001$ ;  $p_{\text{ИО-К}} < 0.01$ ; рис. 1б). Важно отметить, что наиболее низкая скорость потребления кислорода стимулированными CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами памяти была отмечена у ИН ( $p_{\text{ИН-ИО}} < 0.05$ ).

Показатель, отражающий скорость ацидификации среды CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти, у ИН был

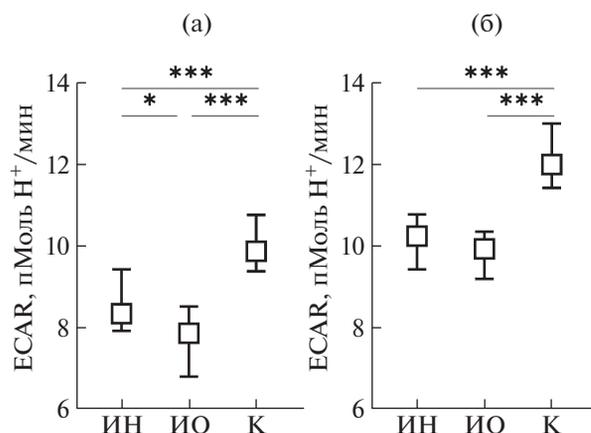
ниже, чем у К ( $p < 0.001$ ), однако превышал соответствующее значение, установленное у ИО ( $p < 0.05$ ; рис. 2а).

Внесение ФГА вызывало увеличение интенсивности гликолиза в клетках, что сопровождалось ростом значений ЕСАР во всех исследуемых группах ( $p < 0.01$ ). При этом в обеих группах ВИЧ-инфицированных пациентов интенсивность этого процесса так и не достигла уровня, характерного для лимфоцитов здоровых субъектов ( $p < 0.001$ ; рис. 2б). Между показателями ИН и



**Рис. 1.** Базальная скорость потребления кислорода CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию.

По оси абсцисс: группы больных; по оси ординат: (а) скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate – OCR) нестимулированными CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клетками; (б) скорость потребления кислорода CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, стимулированными фитогемагглютинином. Представлены медианы (горизонтальные линии внутри прямоугольников), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90%-ные интервалы (вертикальные отрезки). ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  (U-тест Манна–Уитни).



**Рис. 2.** Скорость ацидификации среды CD4<sup>+</sup> Т-клетками памяти ВИЧ-инфицированных иммунологических неответчиков на высокоактивную антиретровирусную терапию.

По оси абсцисс: группы больных; по оси ординат: (а) скорость ацидификации среды (extracellular acidification rate – ECAR) нестимулированными CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-клетками; (б) скорость ацидификации среды CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, стимулированными фитогемагглютинином. Представлены медианы (квадраты) и интерквартильные размахи (вертикальные отрезки). ИН – иммунологические неответчики; ИО – иммунологические ответчики; К – контроль. \* –  $p < 0.05$ , \*\*\* –  $p < 0.001$  (U-тест Манна–Уитни).

ИО статистически значимых отличий обнаружено не было ( $p > 0.05$ ).

Таким образом, в настоящей работе нами впервые показано, что у ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих ВААРТ, снижена активность аэробного гликолиза в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти. Более того, впервые отмечено, что у иммунологических неответчиков на лечение по сравнению со здоровыми добровольцами и ВИЧ-позитивными пациентами, давшими стандартный ответ на терапию, уменьшение гликолитической активности в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти сопровождается существенным снижением уровня митохондриального дыхания. Несмотря на то что под действием стимуляции интенсивность окислительного фосфорилирования в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти иммунологических неответчиков увеличивается, показатели этих пациентов не достигают значений, зафиксированных у ИО и здоровых субъектов. В совокупности полученные данные указывают на выраженное нарушение дыхательной функции митохондрий в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти ВИЧ-инфицированных пациентов с неэффективным восстановлением иммунной системы в ответ на ВААРТ. Следует отметить, что представленные результаты функциональных тестов подтверждают данные, полученные нами ранее при исследовании CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти *ex vivo* [5]. В частности, было установлено, что у иммунологических неответчиков на ВААРТ по сравнению с лицами, давшими стандартный ответ на лечение, в активированных/циклирующих CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах памяти подавлена экспрессия генов, вовлеченных в энергетический обмен, в том числе кодирующих комплексы дыхательной цепи и ферменты цикла трикарбоновых кислот. Более того, активированные/циклирующие CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ИИ имели сниженный трансмембранный потенциал митохондрий, что не зависело от массы органелл.

Как было отмечено ранее, способность Т-клеток к делению напрямую зависит от активности митохондриального дыхания. Действительно, недавнее исследование показало, что внесение ингибитора комплекса II электрон-транспортной цепи в культуру Т-лимфоцитов приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и пролиферативной активности данных клеток [13]. Аналогичный эффект на пролиферацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток оказывает ротенон – ингибитор комплекса I [11]. Кроме того, было показано, что в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах нокаут гена *IRF4*, участвующего в регуляции метаболизма глюкозы и окислительного фосфорилирования, вызывает снижение активности дыхательной цепи и предотвращает деление [14]. Ранее нами также было установлено, что активированные/циклирующие CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти ВИЧ-инфицированных

пациентов с неэффективным восстановлением иммунитета не способны к продуктивной пролиферации *in vitro* и обладают низкой жизнеспособностью [5]. Представленные данные впервые позволяют заключить, что у иммунологических неответчиков на ВААРТ низкая регенераторная способность CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти может быть связана с нарушением процессов гликолиза и митохондриального дыхания.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 20-415-596002. В работе было использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collier A.C., Coombs R.W., Schoenfeld D.A., et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group // N Engl J Med. 1996. V. 334. № 16. P. 1011–1017.
2. Autran B., Carcelain G., Li T.S., et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4<sup>+</sup> T cell homeostasis and function in advanced HIV disease // Science. 1997. V. 277. № 5322. P. 112–116.
3. Kelley C.F., Kitchen C.M., Hunt P.W., et al. Incomplete peripheral CD4<sup>+</sup> cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment // Clin Infect Dis. 2009. V. 48. № 6. P. 787–794.
4. Piketty C., Weiss L., Thomas F., et al. Long-term clinical outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with discordant immunologic and virologic responses to a protease inhibitor-containing regimen // Journal of Infectious Diseases. 2001. V. 183. № 9. P. 1328–1335.
5. Younes S.A., Talla A., Ribeiro S.P. et al. Cycling CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction // J Clin Invest. 2018. V. 128. № 11. P. 5083–5094.
6. Koehne G., Zeller W., Stocksclaeder M., et al. Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation // Bone Marrow Transplant. 1997. V. 19. № 2. P. 149–156.
7. Wahl D.R., Byersdorfer C.A., Ferrara J.L., et al. Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation // Immunol Rev. 2012. V. 249. № 1. P. 104–115.
8. Donnelly R.P., Finlay D.K. Glucose, glycolysis and lymphocyte responses // Mol Immunol. 2015. V. 68. № 2. P. 513–519.
9. Diebold L., Chandel N.S. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells // Free Radic Biol Med. 2016. V. 100. P. 86–93.
10. Ahn C.S., Metallo C.M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation // Cancer Metab. 2015. V. 3. № 1. P. 1.

11. Cao Y., Rathmell J.C., Macintyre A.N. Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e104104.
12. Korencak M., Byrne M., Richter E., et al. Effect of HIV infection and antiretroviral therapy on immune cellular functions // *JCI Insight*. 2019. V. 4. № 12. P. 126675.
13. Nastasi C., Willerlev-Olsen A., Dalhoff K., et al. Inhibition of succinate dehydrogenase activity impairs human T cell activation and function // *Sci Rep*. 2021. V. 11. № 1. P. 1458.
14. Mahnke J., Schumacher V., Ahrens S., et al. Interferon Regulatory Factor 4 controls TH1 cell effector function and metabolism // *Sci Rep*. 2016. V. 6. P. 35521.

## METABOLIC FEATURES OF ACTIVATED MEMORY CD4<sup>+</sup> T-CELLS DERIVED FROM HIV-INFECTED IMMUNOLOGICAL NON-RESPONDERS TO HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY

V. V. Vlasova<sup>a,#</sup>, E. V. Saidakova<sup>a</sup>, L. B. Korolevskaya<sup>a</sup>, N. G. Shmagel<sup>b</sup>,  
Academician of the RAS V. A. Chereshnev<sup>a,c</sup>, and K. V. Shmagel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases, Perm, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: violetbaudelaire73@gmail.com*

Immunological non-responders (INR) are HIV-infected subjects that fail to restore CD4<sup>+</sup> T-cell counts despite undetectable HIV viral load, which is controlled by highly active antiretroviral therapy (HAART). In INR, impaired immune restoration is linked to low-productive proliferation of memory CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes. Taking into account that T-cell ability to divide depends on the activity of metabolic pathways, we aimed to determine rates of mitochondrial respiration and glycolysis in memory CD4<sup>+</sup> T-cells of INR. Two groups of HIV-infected HAART-treated patients were studied: immunological non-responders and subjects with an adequate immunological response to therapy (immunological responders – IR). Healthy control (HC) group comprised uninfected volunteers. In both groups of HIV-infected patients glycolytic activity of memory CD4<sup>+</sup> T-cells was lower than that in HC. Mitochondrial respiration rate in memory CD4<sup>+</sup> T-cells derived from IR was comparable to that of HC at basal state, however, after stimulation IR failed to reach the values of uninfected subjects. INR had the lowest mitochondrial respiration rate both at basal state and after stimulation. Taken together, the data presented herein demonstrate that low regenerative potential of memory CD4<sup>+</sup> T-cells derived from INR might be linked to diminished lymphocytes' metabolic activity.

*Keywords:* HIV-infection, highly active antiretroviral therapy, CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, metabolism, glycolysis, mitochondria

УДК 599.4:591.111:57.02

## ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПЕРЕЛЕТНОГО (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) И ОСЕДЛОГО (*Myotis dasycneme* Voie, 1825) ВИДОВ РУКОКРЫЛЫХ ФАУНЫ УРАЛА

© 2021 г. Л. А. Ковальчук<sup>1,\*</sup>, В. А. Мищенко<sup>1</sup>, Л. В. Черная<sup>1</sup>, академик РАН В. Н. Большаков<sup>1</sup>

Поступило 19.08.2021 г.  
После доработки 03.09.2021 г.  
Принято к публикации 03.09.2021 г.

Впервые представлены результаты сравнительного анализа гематологических параметров рукокрылых из природных популяций Уральского региона: у прудовой ночницы (*Myotis dasycneme* Voie, 1825) – оседлый вид и у двухцветного кожана (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) – перелетный вид. Показаны значимые различия по содержанию в крови лейкоцитов ( $p = 0.05$ ), эритроцитов и тромбоцитов ( $p = 0.001$ ) и установлены межвидовые различия в лейкограммах как по содержанию гранулоцитов ( $p = 0.04$ ), так и агранулоцитов ( $p = 0.05$ ). Для мигрирующих *V. murinus* характерен значительный вклад неспецифической защитной системы крови (54.9%) в адаптивные реакции организма. У прудовой ночницы выраженный лимфоцитарный профиль (58.5%) свидетельствует об активации приобретенного адаптивного иммунитета. Двухцветные кожаны в сравнении с прудовыми ночницами характеризуются более высоким уровнем врожденного иммунитета.

*Ключевые слова:* летучие мыши, гранулоциты, лимфоциты

**DOI:** 10.31857/S2686738921060068

Изучение механизмов адаптации рукокрылых представляет особый интерес в связи с их уникальными биологическими характеристиками: приспособление к активному полету, сезонные миграции и впадение в зимнюю спячку, сопровождающееся физиологической гипотермией и состоянием торпора. Фауна летучих мышей Урала изучена достаточно полно [1]. Однако при значительном фактическом материале по их биологии и экологии основная информация о функциональных возможностях системы крови насекомых летающих летучих мышей, обеспечивающих адаптивную стратегию оседлых и перелетных видов, явно ограничена [2–4].

Представленная статья посвящена проблемам формирования адаптивной стратегии летучих мышей в поддержании гомеостаза животных при воздействии перманентно изменяющихся факторов среды. Сравнительный анализ иммуногематологических параметров двух видов экологически контрастных насекомых летающих летучих мышей из природных популяций Уральского региона:

прудовой ночницы и двухцветного кожана проводится впервые.

Животные отловлены паутинными сетями в зонах массового обитания летних колоний на территории Челябинской области (55°00′55″ N, 60°09′30″ E) в июле 2014 г. В качестве объектов исследования были взяты многочисленные и широко распространенные на Урале виды летучих мышей: двухцветный кожан *Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758 (мезофильный перелетный вид) отловлен на побережье оз. Большой Кисегач, прудовая ночница *Myotis dasycneme* Voie, 1825 (бореальный оседлый и зимующий вид) – в окрестностях оз. Малое Миассово. Прудовая ночница в основном зимует в пещерах, начиная со второй половины сентября до начала мая при температурах от 0 до +2°C в условиях чрезвычайно высокой влажности. Двухцветный кожан в мае месяце прилетает на Южный Урал в места выведения потомства, а во второй половине августа мигрирует на расстояние несколько тысяч километров в юго-западном направлении к местам зимовки [1]. Животных без признаков заболеваний доставляли в лабораторию в отдельных контейнерах в день отлова. Экспериментальные группы ( $n = 9$ ) представлены сеголетками (*subadultus*). Содержание рукокрылых осуществляли согласно международным принципам Хельсинкской декларации [5].

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

**Таблица 1.** Показатели периферической крови летучих мышей. Среднее арифметическое ( $X_{Mboot}$ ), ошибка среднего ( $SE_{boot}$ ) и доверительный интервал ([95%  $CI_{boot}$ ]) бутстреп-распределения

Показатели	Прудовая ночница	Двухцветный кожан	<i>p</i>
Эритроциты (RBC), Т/л	5.7 ± 0.4 [5.0–6.3]	9.2 ± 0.6* [8.1–10.6]	0.001
Лейкоциты, Г/л	3.3 ± 0.5 [2.4–4.4]	5.9 ± 0.8* [4.1–7.6]	0.05
Гемоглобин (HGB), г/л	101.5 ± 5.6 [89.8–110.5]	127.1 ± 8.1 [111.8–142.8]	0.08
Гематокритный показатель (HCT), %	29.9 ± 1.9 [25.6–32.9]	33.3 ± 1.5 [30.6–36.5]	0.29
Средний объем эритроцита (MCV), фл	52.3 ± 0.5 [51.6–53.4]	36.8 ± 1.1* [34.7–39.1]	0.001
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	17.8 ± 0.2 [17.4–18.2]	13.9 ± 0.4* [13.2–14.8]	0.001
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/л	340.9 ± 4.7 [333.0–350.3]	379.5 ± 7.3* [365.0–394.2]	0.001
Тромбоциты (PLT), г/л	213.1 ± 28.0 [160.5–265.5]	476.3 ± 26.1* [421.2–522.0]	0.001
Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	6.6 ± 0.1 [6.4–6.9]	5.2 ± 0.2* [4.8–5.5]	0.001
Тромбокрит (PCT), %	0.1 ± 0.0 [0.1–0.2]	0.3 ± 0.0* [0.2–0.3]	0.02

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами, ANOVA с перестановочным тестом,  $p \leq 0.05$ .

Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге K-23D (Германия) в вакутайнерах “Bekton Dickinson BP” (Великобритания) с ЭДТА в течение 15 мин при 3000 об/мин. Показатели периферической крови определяли на гематологическом анализаторе “BC-5800” (Mindray, Китай). Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе (на 100 лейкоцитов). У экспериментальных животных исследовано 17 показателей периферической крови. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (PCA) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) [6].

Исследование периферической крови показало, что у двухцветного кожана содержание эритроцитов в 1.6 раза выше, чем у прудовой ночницы ( $p = 0.001$ ) (табл. 1), что при повышенной средней концентрации гемоглобина в эритроците, по-видимому, является отражением эффективного кислородного режима во время длительных перелетов. Этому способствует и уменьшение в крови среднего объема эритроцитов в 1.4 раза ( $p = 0.001$ ), а также двукратное повышение количества тромбоцитов ( $p = 0.001$ ) и тромбокрита ( $p = 0.02$ ) в периферической крови перелетного вида в сравнении с показателями крови прудовых ночниц.

Исследователи рассматривают активацию тромбоцитопоэза при физических нагрузках, действии низких температур и гипоксии, воздействии антропогенных, биотических стресс-факторов в качестве эффекторов иммунной системы [7]. Тромбоциты, участвуя в иммунных и аллергических реакциях наряду с макрофагами, нейтрофилами и эозинофилами, формируют первую ли-

нию защиты организма от патогенов. У двухцветного кожана в сравнении с прудовой ночницей содержание лейкоцитов превышает в 1.8 раза ( $p = 0.05$ ) (табл. 1). Лейкоциты поддерживают гомеостаз, формируя кровяной и тканевой барьеры против микробной, вирусной и паразитарной инфекций.

Метод главных компонент (PCA) позволил визуализировать видовую изменчивость показателей периферической крови двухцветного кожана и прудовой ночницы (рис. 1). Анализ показал, что 77.95% общей дисперсии параметров красной крови и тромбоцитов приходится на первую главную компоненту (PC1) и 12.63% – на вторую (PC2). Наибольший вклад в межвидовую изменчивость показателей красной крови по PC1 вносят эритроциты (13.49%), средний объем эритроцита (13.01%), тромбоциты (12.99%), тромбокрит (12.17%), среднее содержание гемоглобина (11.88%), а их значимые коэффициенты корреляции с PC1 составляют  $-0.97$ ,  $-0.96$ ,  $-0.95$ ,  $-0.92$ ,  $0.91$  – соответственно ( $p = 0.001$ ).

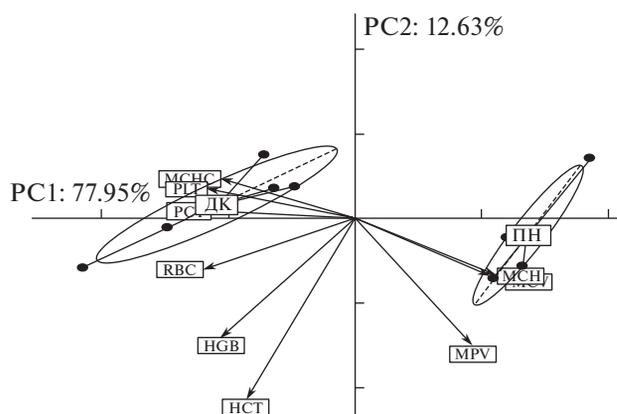
Первая главная компонента по этим переменным четко выделяет в самостоятельные группы оседлый (ПН) и перелетный (ДК) виды (рис. 1). Вторая главная компонента PC2 сильно коррелирует ( $-0.70$ ) с гематокритным показателем (вклад 43.20%), и в меньшей степени – с гемоглобином (вклад 18.86%), что также подтверждает неоднородность особей исследованных двух экологически контрастных видов по данным показателям.

Лейкоцитарный состав крови рукокрылых представлен гранулоцитами (нейтрофилы: юные, палочкоядерные, сегментоядерные и эозинофилы) и агранулоцитами (моноциты и лимфоциты) (табл. 2).

Лимфоциты, как основа гуморального иммунитета, ограничивают распространение инфекций, участвуя в адекватном иммунологическом ответе организма [8]. У оседлого вида *M. dasycneme* следует отметить высокое содержание лимфоцитов (56.0%), обеспечивающих значительную эффективность клеточного иммунитета ( $p = 0.04$ ). Показательна активная неспецифическая защита организма от токсических воздействий, вирусных и бактериальных инфекций у перелетного вида – двухцветного кожана, что обеспечивается повышенным уровнем нейтрофилов ( $p = 0.01$ ) (табл. 2).

Межвидовых различий в лейкограммах исследуемых животных как по содержанию моноцитов ( $p = 0.38$ ), так и по содержанию эозинофилов ( $p = 0.39$ ) не выявлено, что свидетельствует об идентичности адаптивных механизмов исследуемых широко распространенных видов рукокрылых уральской фауны. Известно, что моноциты, выполняя фагоцитарную роль, продуцируют эндогенные регуляторы иммунного ответа – провоспалительные цитокины [7, 9]. Эозинофилы, активно циркулирующие в крови у прудовой ночницы и у двухцветного кожана, обеспечивают противогельминтную иммунную защиту организма. Необходимо отметить, что у летучих мышей, как и у всех позвоночных, лейкоцитарные клетки периферической крови ответственны за проявление реакций врожденного (естественного) иммунитета, так и адаптивного (приобретенного) иммунного ответа [8, 9].

Показаны значимые межвидовые различия летучих мышей по содержанию гранулоцитов и агранулоцитов, отражающих взаимосвязь эффекторных механизмов иммунной системы животных. В лимфоцитарно-гранулоцитарном составе периферической крови прудовой ночницы преобладают агранулоциты (58.5%), обеспечивающие иммунный надзор и специфическую реактивность организма (адаптивный иммунитет).



**Рис. 1.** Показатели красной крови двух видов летучих мышей в пространстве первых двух главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями; эллипсы представляют собой 95% доверительные области; ПН – прудовая ночница, ДК – двухцветный кожан.

У мигрирующего двухцветного кожана преобладают гранулоциты (54.9%), формирующие неспецифическую линию защиты при активации естественного врожденного иммунитета. Именно эта врожденная иммунная система защиты быстрее и эффективнее реагирует на широкий спектр биотических и абиотических факторов среды обитания по сравнению с адаптивными приобретенными ответами. Мигрирующие двухцветные кожаны характеризуются более высоким уровнем врожденного иммунитета в сравнении с прудовой ночницей.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют впервые оценить гематологические параметры двухцветного кожана и прудовой ночницы, иллюстрируя видовую специфику эффекторных механизмов иммунной си-

**Таблица 2.** Лейкоцитарный состав периферической крови летучих мышей. Среднее арифметическое ( $X_{M\text{boot}}$ ), ошибка среднего ( $SE_{\text{boot}}$ ) и доверительный интервал ( $[95\% CI_{\text{boot}}]$ ) бутстреп-распределения

Показатели	Прудовая ночница	Двухцветный кожан	$p$
Нейтрофилы, %	$39.8 \pm 1.4$ [37.0–42.5]	$54.0 \pm 3.3^*$ [47.2–60.2]	0.01
• юные, %	$2.5 \pm 1.1$ [0.5–4.8]	$8.0 \pm 1.3^*$ [5.2–10.4]	0.05
• палочкоядерные, %	$26.0 \pm 3.2$ [18.8–30.0]	$24.6 \pm 3.0$ [18.8–30.6]	0.77
• сегментоядерные, %	$11.2 \pm 2.9$ [6.0–16.8]	$21.4 \pm 2.5^*$ [17.6–27.0]	0.05
Лимфоциты, %	$56.0 \pm 1.8$ [52.3–59.0]	$43.4 \pm 3.1^*$ [37.6–49.2]	0.04
Моноциты, %	$2.5 \pm 0.8$ [0.8–3.8]	$1.6 \pm 0.8$ [0.4–3.4]	0.38
Эозинофилы, %	$1.3 \pm 0.4$ [0.5–2.0]	$1.0 \pm 0.3$ [0.4–1.6]	0.39
Гранулоциты, %	$41.0 \pm 1.8$ [37.5–44.5]	$54.9 \pm 3.4^*$ [48.0–61.4]	0.04
Агранулоциты, %	$58.5 \pm 2.1$ [54.5–62.5]	$44.9 \pm 3.5^*$ [38.6–52.0]	0.05

Примечание: \* – статистически значимые различия между группами, ANOVA с перестановочным тестом,  $p \leq 0.05$ .

стемы животных, обусловленную в свою очередь эколого-физиологическими особенностями оседлых и перелетных видов летучих мышей из природных популяций Уральского региона.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы искренне признательны с.н.с. Южно-Уральского федерального научного центра минералогии и геоэкологии УрО РАН, к.б.н. В.П. Снитко за помощь в отлове животных.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли согласно международным принципам Хельсинкской декларации.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитко В.П.* Летучие мыши Урала. Екатеринбург, 2005.
2. *Kovalchuk L., Mishchenko V., Chernaya L., et al.* Haematological parameters of pond bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825, Chiroptera: Vespertilionidae) in the Ural Mountains // *J. Zoology and Ecology*. 2017. V. 27. № 2. P. 168–175.
3. *Узенбаева Л.Б., Кижина А.Г., Илюха В.А., и др.* Морфология и состав клеток периферической крови при спячке у летучих мышей (Chiroptera, Vespertilionidae) северо-запада России // *Известия РАН. Серия Биологическая*. 2019. № 4. С. 419–428.
4. *Mishchenko V.A., Kovalchuk L.A., Bolshakov V.N., et al.* Comparative Analysis of the Amino Acid Spectrum of Blood Plasma in Chiroptera (*Vespertilio murinus* L., 1758 and *Myotis dasycneme* B., 1825) in the Fauna of the Ural Mountains // *Doklady Biological Sciences*. 2018. V. 481. № 6. P. 157–159.
5. *Yarri D.* The Ethics of Animal Experimentation. Oxford: Oxford University Press. 2005.
6. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade 4 package-I: One-table methods // *R News*. 2004. № 4. P. 5–10.
7. *Черешнев В.А., Шмагель К.В.* Иммунология. М.: изд-во Центр стратегического партнерства, 2014.
8. *Davis F.R., Maney D.L., Maers J.C.* The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // *Functional Ecology*. 2008. V. 22. P. 760–772.
9. *Coico R., Sunshine G., Benjamini E.* Immunology. A Short Course. Hoboken, NJ: Wiley-Liss Publications. 2003.

## FEATURES OF IMMUNOHEMATOLOGICAL PARAMETERS OF MIGRATORY (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) AND RESIDENT (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) BAT SPECIES OF THE URAL FAUNA

L. A. Kovalchuk<sup>a,#</sup>, V. A. Mishchenko<sup>a</sup>, L. V. Chernaya<sup>a</sup>, and academician of the RAS V. N. Bolshakov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Plant and Animal Ecology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

For the first time, the results of a comparative analysis of hematological parameters of bats from natural populations of the Ural region are presented: the pond bat (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) has a resident species and the two-colored bat (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) has a migratory species. Significant differences in the content of white blood cells ( $p = 0.05$ ), red blood cells and platelets ( $p = 0.001$ ) were shown. Interspecific differences were found in the leukograms of the studied bats both in the content of granulocytes ( $p = 0.04$ ) and agranulocytes ( $p = 0.05$ ). For migrating *V. murinus* is characterized by a significant contribution of the nonspecific protective system of the blood (54.9%) to the adaptive reactions of the body. In the pond bat, a pronounced lymphocytic profile (58.5%) indicates the activation of acquired adaptive immunity. Two-colored bats leathers in comparison with pond bats are characterized by a higher level of innate immunity.

*Keywords:* bats, peripheral blood, granulocytes, lymphocytes

УДК 57.023

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТенок КОРНЕЙ И ПОБЕГОВ ЯЧМЕНЯ

© 2021 г. Н. Р. Мейчик<sup>1,\*</sup>, Ю. И. Николаева<sup>1</sup>, О. В. Никушин<sup>1</sup>, М. А. Кушунина<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН М.П. Кирпичниковым

Поступило 20.06.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принято к публикации 30.06.2021 г.

Впервые определены ионообменные свойства клеточных стенок (КС), изолированных из корней и побегов ячменя, выращенного в условиях полиметаллического загрязнения. Установлено, что в побегах содержание в КС всех типов катионообменных групп значительно выше, чем в корнях, что обуславливает более высокую металл-связывающую способность КС побегов и степень гидратации ее полимеров. Впервые показано, что воздействие избытка тяжелых металлов на растения приводит к возрастанию содержания деметилованных пектинов в КС побегов.

*Ключевые слова:* клеточная стенка, ионообменные свойства, тяжелые металлы, ячмень

**DOI:** 10.31857/S2686738921060123

Клеточная стенка (КС) – это сложноорганизованная и многофункциональная структура, первая вступающая в контакт с внешним раствором и модифицирующая его состав за счет реакций обмена между ионогенными группами полимеров КС и ионами раствора. Структурные и ионообменные характеристики КС определяют ионный состав среды, которая омывает клеточную мембрану, контролируют перенос растворенных веществ в клетку и влияют на механические и осмотические явления, связанные с ростом клеток [1]. КС является не только сложной, но и динамичной структурой, состав и организация которой могут изменяться в процессе онтогенеза и под действием внешних факторов [2, 3]. Кроме того, реакции ионного обмена в КС клеток корня регулируют поступление веществ в корни растений [4–6], а при повышенной концентрации тяжелых металлов (ТМ) в почвенном растворе КС выступает как первый защитный барьер на пути их поступления в цитоплазму клеток корня, эффективность которого обусловлена ионообменной способностью КС в отношении катионов металлов [5].

Ионообменные свойства КС в отношении двух- и трехвалентных катионов металлов глав-

ным образом определяются содержанием деметилированных карбоксильных групп галактуроновой кислоты [4, 7] в составе пектиновых веществ. В то же время и другие компоненты КС (белки, аминокислоты и фенольные соединения) также принимают участие в связывании и накоплении ТМ в апопласте [6, 7]. Однако в литературе имеются лишь ограниченные данные об изменении количества ионогенных групп полимеров КС в условиях избытка ТМ в среде, а влияние совместного присутствия нескольких токсичных металлов на ионообменные свойства КС у злаковых растений никогда ранее не изучалось.

В настоящей работе мы впервые определили ионообменные свойства КС корней и побегов ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт «Биом») в условиях полиметаллического загрязнения.

Растения выращивали в водной культуре (по 60 растений на сосуд объемом 3 л) в климатической камере (24°C, освещенность 100 мкмоль квантов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>, 16 ч день) при постоянной аэрации растворов. Контрольные растения выращивали на питательном растворе, содержащем (мкМ): K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 147.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5, MgSO<sub>4</sub> – 95, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> – 120, CaCl<sub>2</sub> – 620, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – 275, MnSO<sub>4</sub> – 0.5, ZnSO<sub>4</sub> – 0.5, CuSO<sub>4</sub> – 0.2, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> – 0.01, NaCl – 10, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 1, FeSO<sub>4</sub> – 6, и 2.22 г/л ЭДТА. В опытные сосуды через 7 сут после высадки растений дополнительно вносили растворы ТМ до конечной концентрации: а) опытный вариант с суммарной концентрацией ТМ 65.5 мкМ:

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии растений, Москва, Россия

\*e-mail: meychik@mail.ru

**Таблица 1.** Сухая масса корня ( $G_{\text{корня}}$ , мг) и надземной части ( $G_{\text{надз}}$ , мг) одного растения, их оводненность ( $Q_{\text{корни}}$ ,  $Q_{\text{надз}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сухой массы органа), доля КС от общей сухой массы корней и надземной части ( $G_{\text{корни}}^{\text{КС}}$ ,  $G_{\text{надз}}^{\text{КС}}$ ) растений ячменя, выращенных на контрольной среде и средах с добавлением 65.5 мкМ и 131 мкМ ТМ. Приведены средние значения и их стандартные ошибки

Вариант	$G_{\text{корня}}$	$G_{\text{надз}}$	$Q_{\text{корни}}$	$Q_{\text{надз}}$	$G_{\text{корни}}^{\text{КС}}$	$G_{\text{надз}}^{\text{КС}}$
контроль	$11.33 \pm 0.53$	$41.91 \pm 3.82$	$15.47 \pm 0.48$	$10.70 \pm 0.05$	$0.53 \pm 0.02$	$0.41 \pm 0.01$
65.5 мкМ ТМ	$12.33 \pm 0.75$	$43.63 \pm 1.45$	$12.06 \pm 1.25$	$9.28 \pm 0.25$	$0.51 \pm 0.03$	$0.41 \pm 0.01$
131 мкМ ТМ	$11.70 \pm 0.49$	$38.08 \pm 0.74$	$11.78 \pm 0.51$	$9.74 \pm 0.28$	$0.51 \pm 0.01$	$0.41 \pm 0.00$

$\text{Al}^{3+} - 10$ ;  $\text{Mn}^{2+} - 25$ ;  $\text{Cd}^{2+} - 1.4$ ;  $\text{Cu}^{2+} - 1$ ;  $\text{Ni}^{2+} - 8$ ;  $\text{Zn}^{2+} - 20$ ;  $\text{Pb}^{2+} - 0.15$  мкМ; б) опытный вариант с суммарной концентрацией ТМ 131 мкМ:  $\text{Al}^{3+} - 20$ ;  $\text{Mn}^{2+} - 50$ ;  $\text{Cd}^{2+} - 2.8$ ;  $\text{Cu}^{2+} - 2$ ;  $\text{Ni}^{2+} - 16$ ;  $\text{Zn}^{2+} - 40$ ;  $\text{Pb}^{2+} - 0.3$  мкМ. В питательный раствор и для опытных, и для контрольных растений ежедневно вносили раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  из расчета 1 мкмоль на литр среды. Растения выращивали в присутствии ТМ в течение 7 сут, после чего у части растений определяли сырую и сухую массу органов, их оводненность, а оставшиеся использовали для выделения КС (из корней и надземной части) в соответствии с ранее описанной методикой [6]. Исследование ионообменных групп в составе КС проводили методом потенциометрического титрования, как описано ранее [6], при постоянной ионной силе раствора (10 мМ), которую создавали добавлением  $\text{NaCl}$ . Весовой коэффициент набухания КС ( $K^{\text{КС}}$ , г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сухой массы КС) в растворах с рН 4–12 и ионной силой 10 мМ определяли в соответствии с методикой, описанной в [6]. Опыты проводили в 3–6 биологических повторностях для каждой концентрации полиметаллов. Приведены средние значения и их стандартные отклонения или ошибки. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$  или  $p < 0.01$ .

Сухая масса корней и надземной части, а также их оводненность и массовая доля КС в корнях и побегах растений ячменя достоверно не различались по отношению к контролю ни при 65.5 мкМ, ни при 131 мкМ ТМ в среде ( $p < 0.01$ , табл. 1), причем различий не наблюдалось и между вариантами обработки с разной концентрацией ТМ ( $p < 0.01$ , табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие полиметаллических загрязнений в указанных концентрациях не приводит к ингибированию роста растений и не нарушает их водный обмен.

Водный режим в КС регулируется через набухание ее полимерного матрикса, которое изменяется под влиянием состава внешней среды. Способность к набуханию — это свойство полимерного материала, определяемое его строением и составом. Результаты показывают, что коэффициент набухания КС ( $K^{\text{КС}}$ ), изолированных из

корней и надземных частей растений ячменя, увеличивается с рН раствора. С увеличением рН от 4 до 9 этот параметр возрастал от 2.5 до 4.0 и от 2.5 до 5.5 г  $\text{H}_2\text{O}$ /г сухой массы КС в корнях и в побегах соответственно. Существенные отличия в набухании были обнаружены между КС корней и побегов: у последних значение этого показателя было в 1.4–1.5 раза выше вне зависимости от среды выращивания.

Во всех вариантах при рН  $> 10.8$  катионообменная способность КС достигала максимальных значений ( $S_o^{\text{кат}}$ , табл. 2), которые характеризуют общее количество катионообменных групп, имеющих в полимерной структуре КС. Следует отметить, что в КС как побегов, так и корней были обнаружены и анионообменные группы, но их содержание не превышало 20 мкмоль/г сухой массы КС, что соответствует известным данным [4, 6].

Так же, как и в КС других видов растений [6], в КС, изолированных из корней, и из побегов ячменя, обнаружено три типа катионообменных групп (табл. 2): карбоксильные группы полигалактуроновой (ПГК) и гидроксикоричных (ГКК) кислот, и фенольные ОН-группы. Последние не принимают участия в ионообменных реакциях, так как значение  $\text{pK}_a$  этих групп ( $9.66 \pm 0.17$  ед. рН) лежит за пределами физиологической области рН.

Полученные в работе значения  $\text{pK}_a$  ионообменных групп в составе КС ( $\text{pK}_a^{\text{ПГК}} = 4.35 \pm 0.61$ ;  $\text{pK}_a^{\text{ГКК}} = 7.27 \pm 0.15$ ;  $\text{pK}_a^{\text{ФГ}} = 9.66 \pm 0.17$ ) свидетельствуют о том, что их качественный состав одинаков в КС корней и надземной части, тогда как количество групп каждого типа ( $S_i$ , табл. 2) значительно различается между органами растений. Так, в побегах содержание карбоксильных групп ПГК в КС больше, чем в корнях в 3 раза (контрольные растения) и 4 раза (обработанные ТМ растения), карбоксильных групп ГКК — в 1.6 раза (независимо от среды выращивания), фенольных ОН-групп — примерно в 2 раза. Данный факт объясняет различие в величине коэффициента набухания для КС побегов и корней: более высокое содержание всех типов катионообменных групп в

**Таблица 2.** Содержание катионообменных групп каждого типа ( $S_i$ , мкмоль/г сухой массы КС), общее содержание катионообменных групп ( $S_o^{кат}$ , мкмоль/г сухой массы КС) в клеточных стенках, изолированных из корней и побегов растений ячменя, выращенных на контрольной среде и средах с добавлением 65.5 мкМ и 131 мкМ ТМ. ПГК – карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; ГКК – карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; ФГ – фенольные ОН-группы. Приведены средние значения и их стандартные отклонения

Вариант		$S_{ПГК}$	$S_{ГКК}$	$S_{ФГ}$	$S_o^{кат}$
контроль	КС корней	40 ± 1	330 ± 30	310 ± 21	678 ± 44
	КС побегов	120 ± 12	540 ± 20	530 ± 20	1230 ± 80
65.5 мкМ ТМ	КС корней	38 ± 2	420 ± 25	340 ± 15	798 ± 32
	КС побегов	160 ± 15	540 ± 20	700 ± 30	1400 ± 70
131 мкМ ТМ	КС корней	39 ± 3	450 ± 32	350 ± 20	838 ± 55
	КС побегов	165 ± 20	700 ± 52	650 ± 25	1515 ± 100

побегах приводит к увеличению содержания электроотрицательного элемента кислорода, что, в свою очередь, увеличивает степень гидратации полимеров КС.

С точки зрения ионообменной способности КС корней слабо отвечают на присутствие в питательной среде полиметаллических загрязнений. Другая ситуация в этих условиях наблюдается для КС, изолированных из надземной части. В ответ на воздействие ТМ происходит увеличение количества как обоих типов карбоксильных групп, так и фенольных ОН-групп в 1.3–1.4 раза по отношению к контролю (табл. 2).

Известно, что у бобовых растений содержание карбоксильных групп ПГК в КС стеблей вдвое выше, чем в КС корней [8]. У исследованных же нами растений ячменя различия достигают четырех раз. Чтобы подтвердить эти данные, был применен еще один метод, основанный на том, что при  $pH < 4$  в ионообменных реакциях с  $Cu^{2+}$  участвуют только карбоксильные группы ПГК [9]. После 72 ч инкубации в 131 мкМ растворе  $CuCl_2$  ( $pH 4.0 \pm 0.2$ ) в КС, изолированных из корней ячменя, содержалось  $22.03 \pm 2.84$  мкмоль  $Cu$ /г сухой массы КС, а в КС надземной части –  $33.77 \pm 0.84$  мкмоль  $Cu$ /г сухой массы КС, вне зависимости от среды, на которой были выращены растения. Поскольку КС, выделенные из корней, связали меньше  $Cu^{2+}$ , можно заключить, что содержание деметилированных пектинов в них значительно ниже по сравнению с КС побегов.

Известно, что в ответ на металл-стресс растения могут реализовывать три стратегии изменения состава КС клеток корня и ее ионообменной способности. Первая из них, обнаруженная большей частью у чувствительных к воздействию ТМ сортов и видов растений, заключается в увеличении массовой доли деметилированных пектинов в КС корней при воздействии таких металлов, как  $Pb$ ,  $Cd$  и  $Cu$  [10, 11]. Вторая, напротив, состоит в уменьшении массовой доли деметилированных пектинов в КС в ответ на избыток ТМ в среде [10,

12]. В данном случае формирование “металл-исключающих” КС препятствует накоплению ТМ в апопласте и, вероятно, также ограничивает симпластное поглощение металла клетками корня [10]. Третья стратегия изменения состава КС обусловлена усилением в равной мере биосинтеза всех компонентов КС, в том числе и пектинов с такой же степенью метилирования, как у контрольных растений. Такой ответ на воздействие повышенных концентраций ионов меди был выявлен у бобовых [13].

В настоящее время считается, что основную роль в связывании ТМ играют карбоксильные группы остатков уроновых кислот в составе пектинов [7]. Полученные нами данные о содержании таких групп в КС корней ячменя (табл. 2) свидетельствуют о том, что металл-связывающая способность КС корней, как и ее массовая доля (табл. 1), не изменяются при обработке полиметаллами, и, следовательно, можно заключить, что модификации состава КС в корнях ячменя не происходит при воздействии ТМ на растения ни в “высокой” (131 мкМ), ни в “низкой” (65.5 мкМ) концентрациях.

Напротив, полученные данные о содержании карбоксильных групп ПГК в КС, выделенных из надземной части растений ячменя, позволяют предположить, что в ответ на воздействие ТМ происходит модификация пектиновых полимеров путем их деметилирования, так содержание карбоксильных групп ПГК возрастает в 1.4 раза (табл. 2), а массовая доля КС в побегах не изменяется по отношению к контролю (табл. 1).

Увеличение содержания фенольных ОН-групп в КС и корней, и побегов ячменя в ответ на действие ТМ может быть обусловлено лигнизацией вторичной КС, так как такой ответ был обнаружен при воздействии других неблагоприятных факторов внешней среды, таких как засуха, пониженные температуры, засоление [14] и дефицит азота в среде [15].

Таким образом, нами впервые показано, что при воздействии ТМ на растения может происходить не только модификация КС корней, как было известно ранее, но и модификация КС побегов, которая заключается в деметилировании пектинов с целью увеличения ионообменной способности КС. Можно предположить, что такой ответ связан с механизмами поступления ТМ в растения ячменя. Вероятно, вследствие небольшого содержания карбоксильных групп ПГК в КС корней, ионы металлов поступают в надземную часть, где накапливаются и инактивируются, в том числе, и в КС.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают об отсутствии конфликтов интересов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (проект № 20-54-00013) и в соответствии с НИР кафедры физиологии растений МГУ (№ 121032300068-8).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grignon C., Sentenac H. // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1991. V. 42. P. 103–128.
2. Carpita N.C., Gibeaut D.M. // *Plant J.* 1993. V. 3. P. 1–30.
3. Fry S.C. // *New Phytol.* 2004. V. 161. № 3. P. 641–675.
4. Sattelmacher B. // *New Phytol.* 2001. V. 149. P. 167–192.
5. Haynes R.J. // *Bot. Rev.* 1980. V. 46. P. 75–99.
6. Meychik N.R., Yermakov I.P. // *Plant Soil.* 2001. V. 234. № 2. P. 181–193.
7. Krzesłowska M. // *Acta Physiol. Plant.* 2011. V. 33. P. 35–51.
8. Meychik N.R., Yermakov I.P., Nikolaeva Yu I., et al. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2010. V. 57. № 5. P. 620–630.
9. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., et al. // *Plant Soil.* 2014. V. 381. № 1–2. P. 25–34.
10. Colzi I., Doumett S., Del Bubba N., et al. // *Env. Exp. Bot.* 2011. V. 72. P. 77–83.
11. Douchiche O., Rihouey C., Schaumann A., et al. // *Planta.* 2007. V. 225. P. 1301–1312.
12. Konno H., Nakashima S., Katoh K. // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 358–364.
13. Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., et al. // *Funct. Plant Biol.* 2016. V. 43. № 5. P. 403–412.
14. Le Gall H., Philippe F., Domon J.M., et al. // *Plants.* 2015. V. 4. P. 112–166.
15. Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Kushunina M.A. // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. V. 72. P. 74–78.

## THE EFFECT OF POLYMETALLIC POLLUTION ON ION-EXCHANGE PROPERTIES OF BARLEY ROOT AND SHOOT CELL WALLS

N. R. Meychik<sup>a,#</sup>, Yu. I. Nikolaeva<sup>a</sup>, O. V. Nikushin<sup>a</sup>, and M. A. Kushunina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Plant Physiology, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: meychik@mail.ru*

Presented by academician of the RAS M.P. Kirpichnikov

For the first time we determined the ion-exchange properties of the cell walls (CWs) isolated from roots and shoots of barley plants grown in the conditions of polymetallic pollution. The content of all the types of cation-exchange groups in the CWs was found to be considerably higher in the shoots than in the roots, which resulted in higher metal-binding capacity of the shoot CWs and higher swelling capacity of CW polymers. It was shown for the first time that the heavy metal excess causes an increase in the content of demethylated pectins in the shoot CWs.

*Keywords:* cell wall, ion-exchange properties, heavy metals, barley

УДК 577.322.75

## ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПЛАЗМИНОГЕНА

© 2021 г. А. Д. Васильева<sup>1,\*</sup>, В. С. Иванов<sup>1</sup>, Л. В. Юрина<sup>1</sup>, М. И. Индейкина<sup>1,3</sup>, А. Е. Бугрова<sup>1</sup>,  
А. С. Кононихин<sup>2</sup>, член-корреспондент РАН Е. Н. Николаев<sup>4</sup>, М. А. Розенфельд<sup>1</sup>

Поступило 19.05.2021 г.

После доработки 16.07.2021 г.

Принято к публикации 17.07.2021 г.

Плазминоген является зимогеном плазмينا, фермента, который играет фундаментальную роль в растворении фибриновых сгустков и во многих других физиологических процессах. Впервые методом хромато-масс-спектрометрии были выявлены посттрансляционные модификации в первичной структуре плазминогена, обработанного физиологически релевантными количествами перекиси водорода. Установлено, что мишенями окислителя являлись остатки метионина и триптофана, локализованные в различных структурных областях плазминогена. Показано, что окисление плазминогена вызывало доз-зависимый эффект снижения фибринолитической активности плазмина, оцениваемой по образованию продуктов деградации фибриногена. Обсуждается возможная антиоксидантная роль метионинов в окислительной модификации плазминогена.

**Ключевые слова:** плазминоген/плазмин, окисление, перекись водорода, масс-спектрометрия, электрофорез, окислительные сайты, антиоксидантные метионины

DOI: 10.31857/S2686738921060159

Плазминоген/плазмин функционирует как наиболее важная внеклеточная протеазная система *in vivo*, вовлекаясь в целый ряд патофизиологических процессов, включая тромбоз и кровотечение, заживление ран, воспаления, инсульты, инфаркты и многие другие [1, 2].

Нативная форма плазминогена (Glu-плазминоген) человека представляет собой полипептидную цепь, содержащую 791 аминокислотный остаток (Glu1-Asn791). Пространственная укладка цепи образует ряд глобулярных модулей: N-терминальный, так называемый *PAN-apple* домен (*PAp*),

пять гомологичных крингл-доменов (KP1–KP5), структура каждого из которых стабилизирована тремя дисульфидными связями, сериновый протеазный домен (*SP*), содержащий каноническую для всех сериновых протеаз каталитическую триаду остатков His603, Asp646 и Ser741, а также гибкий линкер, соединяющий домены KP4 и KP5 между собой [3]. Крингл-домены содержат сайты связывания лизина, которые позволяют плазминогену связывать фибрин и другие субстраты, содержащие N-концевые лизины [4]. Glu-плазминоген находится в закрытой, устойчивой к активации конформации, в которой остатки лизина и аргинина (в частности, Lys50, Arg68 и Arg70), присутствующие на N-концевом домене *PAp*, связываются с лиганд-связывающими сайтами KP-4 и KP-5. Таким образом, закрытая конформация Glu-плазминогена частично опосредуется междуменными взаимодействиями через сайты связывания лизина [5].

Плазминоген может быть активирован в плазмин путем расщепления связи Arg561-Val562. N-концевая часть цепи (Glu1-Arg561) образует цепь А, которая ковалентно связана с цепью В (Ala562-Asn791) посредством дисульфидных связей Cys548-Cys666 и Cys558-Cys566.

В настоящее время общепризнано, что белки выступают в качестве основной мишени для активных форм кислорода (АФК) [6]. Эти произ-

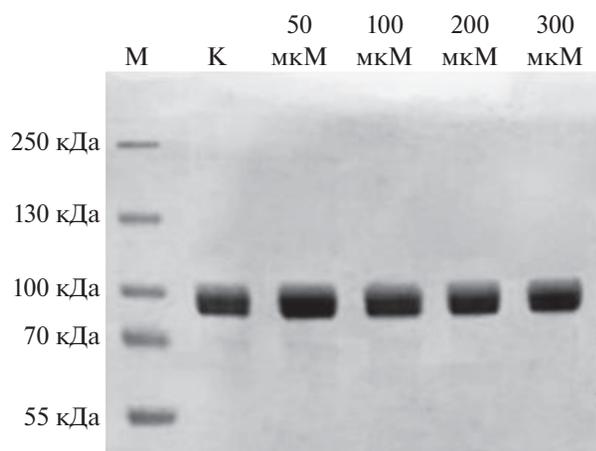
<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (государственный университет)”, Долгопрудный, Россия

<sup>4</sup> Автономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования “Сколковский институт науки и технологий”, Московская обл, деревня Сколково, Россия

\*e-mail: alexandra.d.vasilyeva@gmail.com



**Рис. 1.** Эффект  $H_2O_2$  на молекулу плазминогена. Электрофореграмма свидетельствует об отсутствии каких-либо видимых нарушений в гомогенности полипептидной цепи белка. Полоса М соответствует молекулярным массам белковых маркеров.

водные кислорода способны повреждать белки, что оказывает влияние на их структуру, проявляющееся в более или менее выраженной потере ими свойственных им биохимических функций.

Ранее методом tandemной масс-спектрометрии [7] были идентифицированы сайты, модифицированные гипохлорит-индуцированным окислением молекулы плазминогена.

Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) является существенно менее агрессивным окислителем по сравнению с гипохлоритом. Она вырабатывается большинством клеток человеческого тела. Поступление в плазму  $H_2O_2$ , генерируемой во внутриклеточном пространстве клеток крови, незначительно по сравнению с генерацией  $H_2O_2$  из источников в плазме крови или на внешней поверхности клеток [8]. Помимо НАДФН-оксидаз, плазматические мембраны фагоцитов, эндотелиальные клетки и тромбоциты вносят значительный вклад в генерацию плазменного  $H_2O_2$  [9, 10]. Как полагают [8], значения концентрации  $H_2O_2$  в плазме могут находиться в диапазоне от нескольких мкМ до сотен мкМ, в то время как некоторые авторы [11] сообщают, что концентрация  $H_2O_2$  в плазме человека может быть существенно выше и достигать 100 мМ.

В данной работе впервые была предпринята попытка исследовать действие  $H_2O_2$ -индуцированного окисления плазминогена на модификацию отдельных сайтов в его первичной структуре, а также нарушение фибринолитической (гидролиз фибриногена) активности плазмина, образованного при активации окисленного плазминогена.

Glu-плазминоген был выделен из плазмы крови доноров методом аффинной хроматографии на лизин-активированной CNBr Sepharose 4B (Sigma-Aldrich), как описано ранее [12]. Фибриноген был получен из цитратной плазмы крови человека методом глицинового осаждения [7].

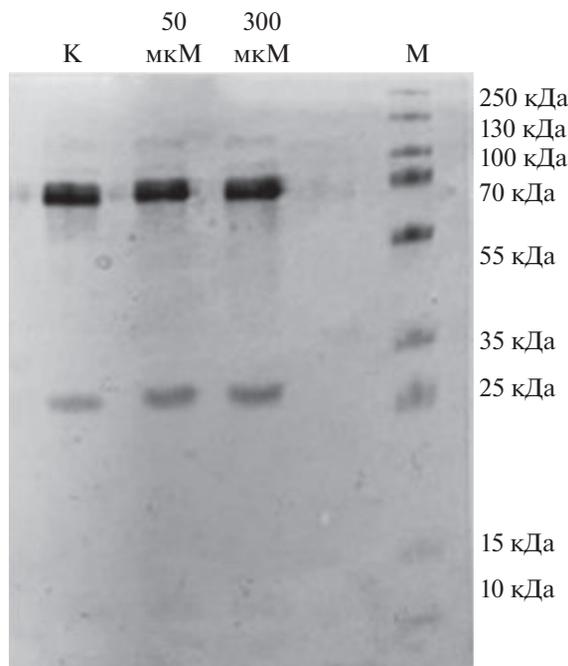
Превращение плазминогена в плазмин осуществляли стрептокиназой (Bechringwerke, Германия) в молярном соотношении 100/1 (плазминоген/стрептокиназа) [7]. Время инкубации смеси плазминогена и стрептокиназы составляло 40 мин при  $37^\circ C$ .

Фибринолитическая активность плазмина оценивалась по накоплению продуктов гидролиза фибриногена с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli.

Окисление плазминогена было индуцировано  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich) в широком диапазоне концентраций окислителя, равным 50–400 мкМ при концентрации субстрата реакции 1 мкМ. После инкубации белка с окислителем (60 мин при  $37^\circ C$ ) реакция была остановлена добавлением в каждый образец десятикратного молярного избытка L-метионина по отношению к окислителю. Для последующих работ (и избавления от метионина) образцы переводились в исходный буфер с использованием ультрацентрифужных фильтров Amicon Ultra, 10 КДа (Millipore, Ирландия).

Анализ, проведенный методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, совмещенный с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), проводился на системе, включающей хроматограф Agilent 1100 с системой автоматического отбора проб (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) и tandemного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra (Thermo, Bremen, Germany) [13, 14]. При подготовке проб образцы обрабатывались дитиотреитолом (DTT) для восстановления дисульфидных связей с последующим алкилированием йодоацетоамидом и гидролизом трипсином (Promega, USA). Триптические пептиды были идентифицированы с помощью программного обеспечения PEAKS Studio (V. 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, On, Canada). Для получения результатов было выполнено три независимых эксперимента, каждый из которых выполнялся в трех повторностях. При сравнении результатов учитывались аминокислоты, не окисленные в контроле, а также те, уровень окисления которых по сравнению с контролем, возрастал более чем на 1%.

Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что при обработке белка окислителем во всем диапазоне концентраций плазминоген сохранял исходную гомогенность, т.е. не наблюдалось ни фрагментации белка, ни межцепочечного



**Рис. 2.** Влияние  $H_2O_2$  на активацию стрептокиназой плазминогена. Как следует из результата электрофореза, активация стрептокиназой нативного плазминогена продуцировала два основных пептида (полоса К), соответствующих тяжелой А, (~70 кДа) и легкой В (~25 кДа) цепям плазмина. Активация стрептокиназой плазминогена, окисленного 50 (1) и 300 мкМ (2)  $H_2O_2$ , не сопровождалась изменениями в электрофоретической подвижности А и В полипептидных цепей плазмина. Полоса М – молекулярные массы белковых маркеров.

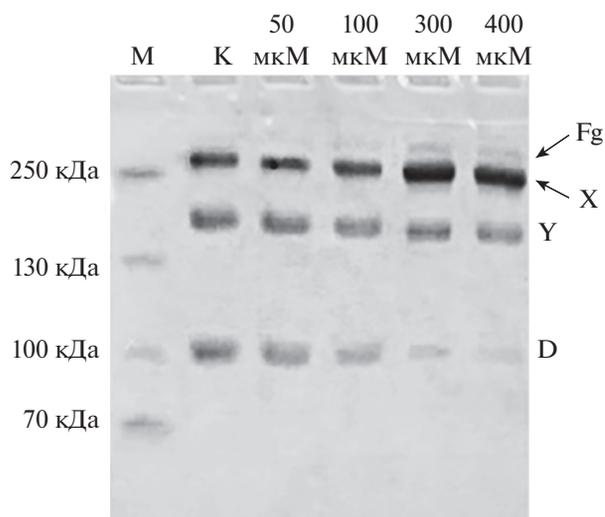
сшивания (рис. 1). Этот результат хорошо согласуется с полученными ранее электрофоретическими данными, которые также демонстрировали сохранение целостности полипептидной цепи плазминогена, обработанного гипохлоритом [7].

Индукцированная стрептокиназой активация плазминогена, как видно из рис. 2, вызывала образование плазмина, о чем свидетельствуют два продукта активации, тяжелая (А) и легкая (В) полипептидные цепи, соответствующие молекулярным массам цепей плазмина, 70 и 25 кДа соответственно. Действие 50 и 300 мкМ  $H_2O_2$  на плазминоген не оказывало влияния на его расщепление стрептокиназой.

Согласно данным ПААГ-электрофореза, обработка плазминогена 50 и 100 мкМ  $H_2O_2$  практически не влияла на гидролиз фибриногена, так как спектр продуктов деградации и их количество не отличались от свойственных контрольному образцу (рис. 3). Однако обработка исходного плазминогена 300 и 400 мкМ окислителя приводила к уменьшению накопленного фрагмента D и сохранению остаточного фибриногена в смеси (рис. 3).

Методом масс-спектрометрии высокого разрешения были проанализированы образцы плазминогена, подвергавшиеся воздействию 50 и 300 мкМ  $H_2O_2$ . Модифицированные аминокис-

лотные остатки и типы их модификации, обусловленные  $H_2O_2$ -индуцированным повреждением белка, показаны в табл. 1.



**Рис. 3.** Фибринолитическая активность плазмина, образованного из окисленного плазминогена, обработанного разными количествами  $H_2O_2$ . Как видно из электрофореграммы, активность плазмина снижается, что проявляется в уменьшении содержания конечного продукта деградации фибриногена, фрагмента D, и сохранении остаточного фибриногена. Полоса М – молекулярные массы белковых маркеров.

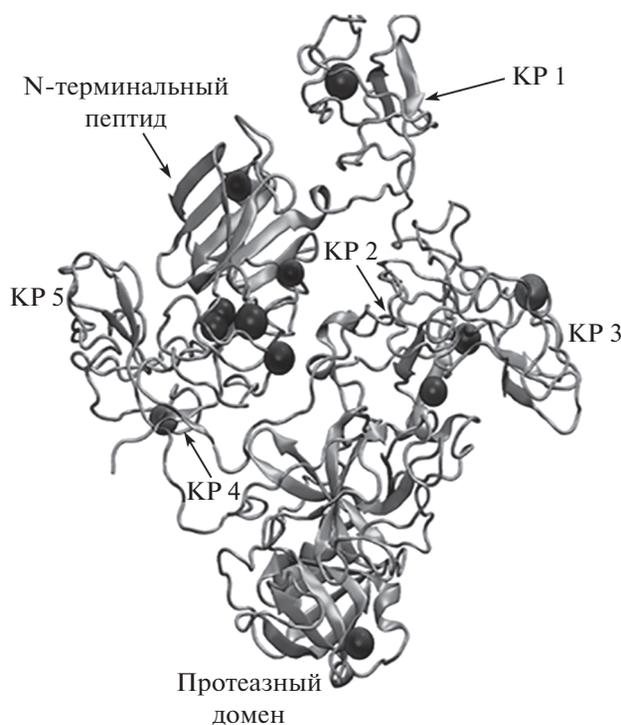
**Таблица 1.** Степени окисления идентифицированных аминокислотных остатков в плазминогене, обработанных 50 и 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и типы окислительных модификаций

Модификация	Аминокислотный остаток	50 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /1 мкМ плазминогена, % (± ст. отклон.)	300 мкМ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /1 мкМ плазминогена, % (± ст. отклон.)
Окисление	Met 57	47.5 ± 7.9	60.0 ± 5.4
Окисление	Trp 108	20.9 ± 3.9	20.1 ± 5.1
Окисление	Met 182	0.0	42.2 ± 10.3
Окисление	Trp 235	3.9 ± 0.7	3.4 ± 1.3
Диокисление	Trp 235	16.5 ± 1.4	19.1 ± 0.9
Диокисление	Trp 304	2.5 ± 0.3	2.1 ± 0.8
Окисление	Met 385	29.7 ± 13.3	73.9 ± 8.6
Диокисление	Trp 382	0.5 ± 0.04	5.6 ± 1.84
Окисление	Trp 382	0.0	1.7 ± 0.5
Окисление	Met 404	69.1 ± 7.6	84.6 ± 3.7
Окисление	Trp 417	18.2 ± 1.3	22.8 ± 2.5
Окисление	Trp 427	38.6 ± 7.5	70.3 ± 9.2
Окисление	Met 463	33.3 ± 12.9	100.0 ± 0.0
Окисление	Met 585	95.5 ± 2.4	100.0 ± 0.0
Окисление	Met 788	12.8 ± 7.4	85.7 ± 2.9

Примечание: степени окисления аминокислотных остатков представлены как разность между средними значениями показателей при индуцированном окислении и в контроле.

Повышение дозы окислителя с 50 до 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> способствовало увеличению степени окисления большинства идентифицированных остатков таких, как Met57, локализованный в *PAp* до-

мене; в домене КР4 – Met385, Met404, Trp417 и Trp427; в КР5 – Met463 и в каталитическом домене – Met585, Met788. В то же время степень окисления Trp108, Trp235 и Trp417, расположенных в



**Рис. 4.** 3D-структура (PDB ID: 4DUU) плазминогена с обозначенными модификациями аминокислотных остатков (черные шары) при окислении белка 300 мкМ перекиси водорода.

доменах КР1, КР2 и КР4, соответственно, практически не изменялась и, кроме того, наблюдалось вовлечение в окислительную модификацию дополнительных двух остатков, Met182 и Trp382, локализованных в структуре КР2 и КР4, соответственно, степень окисления которых при действии 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 4) не отличалась от таковой в контрольном образце. Этот эффект, вероятно, связан с конформационными превращениями в молекуле плазминогена при действии 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, делающих эти два остатка более пространственно доступными для окислителя.

Сравнение окислительных сайтов, возникающих в плазминогене при его обработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или гипохлоритом [7], обнаруживает ряд общих модифицированных остатков метионина, Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met 788 и один остаток триптофана, Trp235, в то время как некоторые остатки, Met463, Trp108, Trp382, Trp417 и Trp427, подвергаются модификации только под влиянием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Что касается метионинов, по всей видимости, Met57, Met404 и Met585 можно рассматривать в качестве антиоксидантных остатков, поскольку они являются общими и наиболее легко окисляемыми для обоих окислителей. Известно, что антиоксидантные метионины локализованы на поверхности белковой глобулы и являются высоко уязвимой мишенью для различных активных форм кислорода (АФК) [15]. Интересно также отметить, что, как указывалось выше, степень окисления некоторых остатков, как, например, Trp108, Trp235 и Trp417 не меняется или меняется крайне незначительно при увеличении концентрации окислителя в 6 раз. Этот феномен может быть обусловлен также антиоксидантной ролью метионинов, которые перехватывают значительную часть окислителя при его увеличивающемся количестве, сохраняя таким образом умеренным окисление других остатков, некоторые из которых могут быть функционально значимыми. Кроме того, нельзя исключить возможность сохранения антиоксидантными метионинами целостности и других, важных в функциональном отношении остатков плазминогена. Идентификация этих остатков представляет огромную важность для понимания функционирования плазминогена в среде, генерирующей АФК, и является предметом будущих исследований.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084-2014-0001) и при поддержке Российского научно-го фонда, № 16-14-00181.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствует конфликт интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray V., Norrving B., Sandercock P., et al. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke // J. Intern. Med. 2010. V. 267. P. 191–208.
2. Weisel J.W. Fibrinogen and fibrin // Adv. Protein Chem. 2005. V. 70. P. 247–299.
3. Castellino F., Ploplis V. Structure and function of the plasminogen/plasmin system // Thromb. Haemost. 2005. V. 93. P. 647–654.
4. Miles L.A., Dahlberg C.M., Plow E.F. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P.11928–11934.
5. Law R.H., Caradoc-Davies T., Cowieson N., et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen // Cell Rep. 2012. V. 1. P. 185–190.
6. Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 805–825.
7. Васильева А.Д., Юрина Л.В., Щеголихин А.Н. и др. Гипохлорит-индуцированная окислительная модификация плазминогена: структурно-функциональные нарушения // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2019. Т. 488. № 5. С. 560–566.
8. Forman H.J., Bernardo A., Davies K.J. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? // Arch. Biochem. Biophys. 2016. V. 603. P. 48–53.
9. Root R.K., Metcalf J., Oshino N., Chance B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors // J. Clin. Invest. 1975. V. 55. P. 945–955.
10. Pastori D., Pignatelli P., Carnevale R., Violi F. Nox-2 up-regulation and platelet activation: Novel insights // Prostaglandins Other Lipid Mediators. 2015. V. 120. P. 50–55.
11. Cavarocchi N.C., England M.D., Schaff H.V., et al. Oxygen free radical generation during cardiopulmonary bypass: correlation with complement activation // Circulation. 1986. V. 74. P. 130–133.
12. Deutsch D.G., Mertz E.T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // Science. 1970. V. 170. P. 1095–1096.
13. Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., et al. Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in Arabidopsis thaliana thylakoid membranes // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011. V. 25. P. 184–190.
14. Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Indeykina M.I., 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 // BBA—Proteins and Proteomics. 2018. V. 1866. P. 875–884.
15. 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.

**PEROXIDE-INDUCED DAMAGE TO PLASMINOGEN MOLECULES**

**A. D. Vasilyeva<sup>a,#</sup>, V. S. Ivanov<sup>a</sup>, L. V. Yurina<sup>a</sup>, M. I. Indeykina<sup>a,c</sup>, A. E. Budrova<sup>a</sup>, A. S. Kononikhin<sup>b</sup>,  
Corresponding Member of the RAS E. N. Nikolaev<sup>d</sup>, and M. A. Rosenfeld<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Center of Chemical Physics,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow, Russian Federation*

<sup>d</sup> *Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail address: alexandra.d.vasilyeva@gmail.com*

Plasminogen is a zymogenic form of plasmin, an enzyme that plays a fundamental role in the dissolution of fibrin clots as well as participating in many other physiological processes. For the first time, by the method of gas chromatography-mass spectrometry post-translational modifications in the primary structure of plasminogen treated with physiologically relevant amounts of hydrogen peroxide were identified. It was found that methionine and tryptophan residues localized in different structural regions of plasminogen served as targets the oxidant. Plasminogen oxidation caused a dose-dependent effect in decreasing the fibrinolytic activity of plasmin evidenced by the formation of fibrinogen degradation products. The possible antioxidant role of methionines in the oxidative modification of plasminogen is discussed.

*Keywords:* plasminogen/plasmin, oxidation, hydrogen peroxide, mass spectrometry, electrophoresis, oxidation sites, antioxidant methionines

УДК 575.224:599.323.4

## ФЕМТОСЕКУНДНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ АКТИВИРУЕТ ЕСТЕСТВЕННУЮ ЗАЩИТУ ОРГАНИЗМА МЫШЕЙ *in vivo*

© 2021 г. Член-корреспондент РАН Г. Р. Иваницкий<sup>1</sup>, С. И. Заичкина<sup>1</sup>, А. Р. Дюкина<sup>1,\*</sup>, В. И. Юсупов<sup>2</sup>, С. С. Сорокина<sup>2</sup>, О. М. Розанова<sup>1</sup>, Е. Н. Смирнова<sup>1</sup>, Д. П. Ларюшкин<sup>1</sup>, Н. В. Минаев<sup>2</sup>, М. М. Поцелуева<sup>1</sup>

Поступило 19.06.2021 г.  
После доработки 29.07.2021 г.  
Принято к публикации 29.07.2021 г.

Показана возможность индукции цитогенетических повреждений в костном мозге, изменения точности лимфоидных органов и состава крови у мышей, облученных низкоинтенсивным фемтосекундным лазерным излучением при плотности потока энергии 5.1, 10.4 и 52 мДж/см<sup>2</sup> (0.5 мВт в течение 5, 10 и 50 с) *in vivo*. С помощью теста “радиационный адаптивный ответ” (0.1 Гр + 1.5 Гр) было обнаружено, что при воздействии на мышей фемтосекундным лазерным излучением в низких дозах наблюдается защитный эффект, т.е. активация естественной защиты организма в том же узком диапазоне плотности потока энергии (2–16 мДж/см<sup>2</sup>), как и при облучении рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр (4 мДж/см<sup>2</sup>). Полученные данные позволяют предположить схожий механизм активации естественной защиты организма при облучении малыми дозами как ионизирующего, так и неионизирующего излучений.

**Ключевые слова:** фемтосекундное лазерное излучение, рентгеновское излучение, мышцы, микроядра, тимус, селезенка, состав крови

**DOI:** 10.31857/S2686738921060032

Известно, что биологические эффекты лазерных излучений зависят от длины волны, длительности воздействия, частоты импульсов, механизмов взаимодействия с облученной тканью и размера ее участка. Изучение механизмов воздействия этих излучений позволило создать различные приборы, применяемые в медицинской практике [1–3]. Созданные в середине восьмидесятых годов фемтосекундные лазеры (ФС), обладающие уникальными свойствами, совершили революцию не только в лазерной физике, но и в физике в целом. Длительность лазерных импульсов составляет от нескольких фс ( $10^{-15}$  с) до нескольких сотен фс. Основными преимуществами фемтосекундного излучения по сравнению с другими импульсными лазерами, помимо малой длительности импульсов, являются высокая пиковая (МВт) и малая средняя (мВт) мощности, что при низкой фокусировке предполагает отсутствие термиче-

ских эффектов. Следует также учитывать, что большая плотность квантов света в ультракоротких импульсах позволяет запустить так называемые многофотонные процессы. Широкое применение ФС лазеры получили в медицине, в частности в офтальмологии, хирургии и других сферах.

Положительные терапевтические эффекты такие, как ускорение ранозаживления, усиление иммунной, нейроэндокринной и антиоксидантной систем, нормализующих уровень холестерина и фосфолипидов, а также эффективность в офтальмологии, хирургии и других областях медицинской практики в основном наблюдаются при больших и средних мощностях низкоинтенсивных лазерных излучений [4]. Что касается биологических эффектов низких доз ФС лазерных излучений на организм млекопитающих *in vivo*, то в настоящий момент они недостаточно изучены, а отдельные имеющиеся результаты трудно сопоставимы в связи с использованием разных объектов, доз, энергий и особенностей оборудования. Количество работ по созданию новых лазеров и использованию их в медицине опережает количество работ по комплексному исследованию биологических реакций и их последствий у облученных животных.

Ранее, нами при изучении цитогенотоксических эффектов на мышцах, предоблученных малыми дозами ионизирующего излучения (гамма и

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Институт фотонных технологий Федерального научного исследовательского центра “Кристаллография и фотоника” Российской академии наук, Москва, Троицк, Россия

\*e-mail: dyukina@rambler.ru

рентген) и затем дополнительно облученных большой дозой, был обнаружен защитный эффект, так называемый феномен “адаптивный ответ” (АО) [5]. Положительный эффект низких доз известен также как радиационный гормезис, который проявляется в качестве защитного эффекта различных форм жизнедеятельности организма [6]. Нами был получен эффект гормезиса на мышцах, облученных рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр по продолжительности жизни [7]. Для сравнения этого феномена при действии малых доз ионизирующего излучения было проведено большое комплексное исследование влияния непрерывного низкоинтенсивного He–Ne лазерного (632.8 нм) и светодиодного инфракрасного (850 нм) излучений на клеточные реакции мышечных, облученных нетерапевтическими низкими дозами, плотность потока энергии которых соответствовала энергиям адаптирующих доз ионизирующего излучения [8, 9]. Анализ результатов показал, что эти дозы не повышали уровня спонтанных цитогенетических повреждений, а при последующем облучении животных выявляющей дозой 1.5 Гр рентгеновского излучения (РИ) были также обнаружены значимые, одинаковые по величине защитные эффекты в той же области доз, как и у положительного контроля при предварительном облучении РИ. Полученные результаты позволили предположить связь индукции радиационного АО с известным феноменом активации естественной защиты организма (гормезис), что позволило в дальнейших модельных экспериментах на мышцах использовать для ее выявления схему радиационного АО (0.1 Гр + 1.5 Гр через 1 сут).

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было проверить эффективность использования низких доз неионизирующего низкоинтенсивного импульсного ФС лазерного излучения (длина волны 525 нм, длительность импульса 200 фс) в качестве фактора активации естественной защиты с помощью теста радиационный “адаптивный ответ” в цельной крови и кровеносных органах мышечных.

В работе использовали 2-месячных самцов белых нелинейных мышечных закрытой популяции SHK (24–28 г), которые содержались в стандартных условиях вивария ИТЭБ РАН. Все манипуляции проводили согласно нормативно-правовым актам Федерации европейских научных ассоциаций о порядке экспериментальной работы с использованием животных (FELASA). План экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 8 от 17.02.2020). Животных облучали в область носа ФС лазерным излучением (525 нм, 200 фс, частота импульсов 70 МГц), при мощности 0.5 мВт в течение 5, 10 и 50 с, что соответствует рассчитанным величинам плотности потока

энергии (флюенса) 5.1, 10.4 и 52 мДж/см<sup>2</sup>. Эти дозы облучения брали исходя из результатов, полученных при действии He–Ne лазерного излучения и РИ на мышечных, для которых ранее была определена область доз, активирующих естественную защиту (2–16 мДж/см<sup>2</sup>) [10].

В качестве положительного контроля животных облучали по той же схеме АО рентгеновским излучением в дозах 0.1 и 0.5 Гр на установке РУТ (4 и 20 мДж/см<sup>2</sup>, 0.1 Гр/мин, 200 кВ, 2 кВ/мкм, 8 мА, 1.0 мм Cu и 1.0 мм Al), (ЦКП “Источники излучения” ИБК РАН, Пущино). Через сутки все группы животных дополнительно облучали РИ в дозе 1.5 Гр (60 мДж/см<sup>2</sup>), а через 28 ч после этого животных выводили из эксперимента методом декапитации и производили забор органов и тканей. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 5 мышечных.

С помощью стандартных методик были определены уровень цитогенетических повреждений в костном мозге подсчетом полихроматофильных (ПХЭ) эритроцитов с микроядрами (МЯ) [11], клеточность тимуса и селезенки по отношению среднего абсолютного веса органа к среднему весу животного в группе, а также показатели клеточного состава цельной крови с помощью прибора Beckman Coulter. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия *U* Манна–Уитни. Вероятность ошибки  $p < 0.05$  считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

В табл. 1 представлены данные по измерению количества цитогенетических повреждений после облучения мышечных адаптирующими дозами исследованных источников излучений и через 28 ч выявляющей дозой 1.5 Гр РИ. Видно, что в данном диапазоне плотности потока энергии не увеличивался уровень спонтанных цитогенетических повреждений (необлученный контроль). Предварительная обработка животных ФС лазерным излучением при плотности потока 10.4 мДж/см<sup>2</sup> и последующим воздействием рентгеновского излучения в дозе 1.5 Гр по схеме радиационного АО вызывала уменьшение цитогенетических повреждений в клетках костного мозга, т.е. активировала естественную защиту. Другие плотности потока ФС лазерного излучения не вызывали защитного эффекта, что совпало с положительным контролем в той же области доз.

Одновременно с измерением цитогенетических повреждений в костном мозге мышечных измеряли индексы массы тимуса и селезенки, которые практически не отличались от таковых значений у необлученных, контрольных животных. В то время как при облучении мышечных только в дозе 1.5 Гр индекс массы тимуса снижался на 40% (рис. 1). Предобработка мышечных ФС лазерным излучением

**Таблица 1.** Количество полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в клетках костного мозга мышей, предоблученных малыми дозами ФС лазера и РИ, и затем облученных в дозе 1.5 Гр

Условие опыта	Число мышей	Поглощенная энергия, мДж	Плотность потока энергии, мДж/см <sup>2</sup> доза излучения	Число ПХЭ	Число ПХЭ с МЯ	Доля ПХЭ с МЯ, %
Фемтосекундный лазер						
0 чистый	10			20000	99	0.49 ± 0.09
5 с	5	0.3 ± 0.1	5.1 ± 0.5	20000	81	0.41 ± 0.13
10 с	5	1.5 ± 0.5	10.4 ± 3.5	20000	76	0.38 ± 0.11
50 с	5	7.5 ± 2.5	52 ± 16	20000	95	0.48 ± 0.15
5 с + 1.5 Гр	5			15000	883	5.90 ± 0.20
10 с + 1.5 Гр	5			17000	819	4.82 ± 0.27*
50 с + 1.5 Гр	5			15000	1010	6.70 ± 0.10
Рентгеновское излучение						
0.1 Гр	5	1.6	4	20000	86	0.43 ± 0.03
0.5 Гр	5	8	20	20000	697	3.50 ± 0.11
0.1 Гр + 1.5 Гр	5			20000	692	3.46 ± 0.17*
0.5 Гр + 1.5 Гр	5			20000	1206	6.03 ± 0.17
1.5 Гр	10	24	60	20000	1347	6.70 ± 0.03

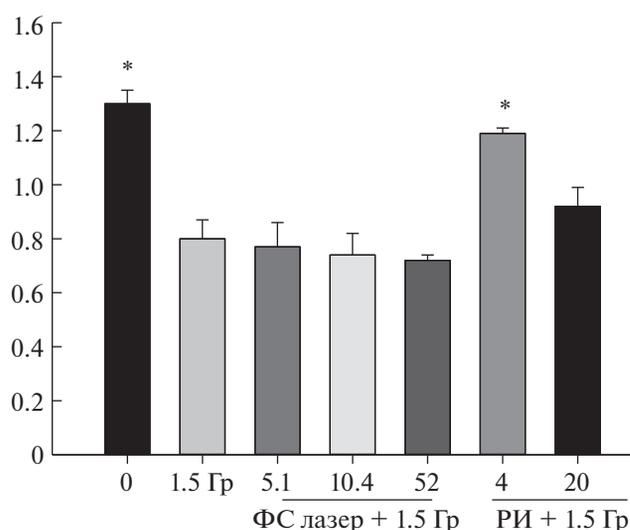
\* $p < 0.05$  по сравнению с группой животных, облученных в дозе 1.5 Гр.

и последующим облучением в дозе 1.5 Гр не восстанавливала индекс массы тимуса до контрольного значения, в отличие от рентгеновского излучения в дозе 4 мДж/см<sup>2</sup>. Аналогичные данные были получены на селезенке.

На рис. 2 показано влияние различных доз ФС лазерного излучения на такие показатели формулы крови как концентрация лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и уровень гемоглобина и гематокрита при последующем облучении выявляющей дозой в 1.5 Гр. На рис. 2а, 2б, 2в отмечено значительное снижение концентрации лейкоцитов и тромбоцитов (на 40–45%), в то время как уровень гемоглобина, гематокрита и концентрация эритроцитов (рис. 2б, 2г, 2д) снизились на меньшую величину – ≈15–20%. При этом действие фактора активации естественной защиты (4 мДж/см<sup>2</sup> + 1.5 Гр), т.е. облучение дозой 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр не оказало ожидаемого эффекта на исследуемые показатели крови, т.е. не индуцировало адаптивного ответа организма по данному критерию.

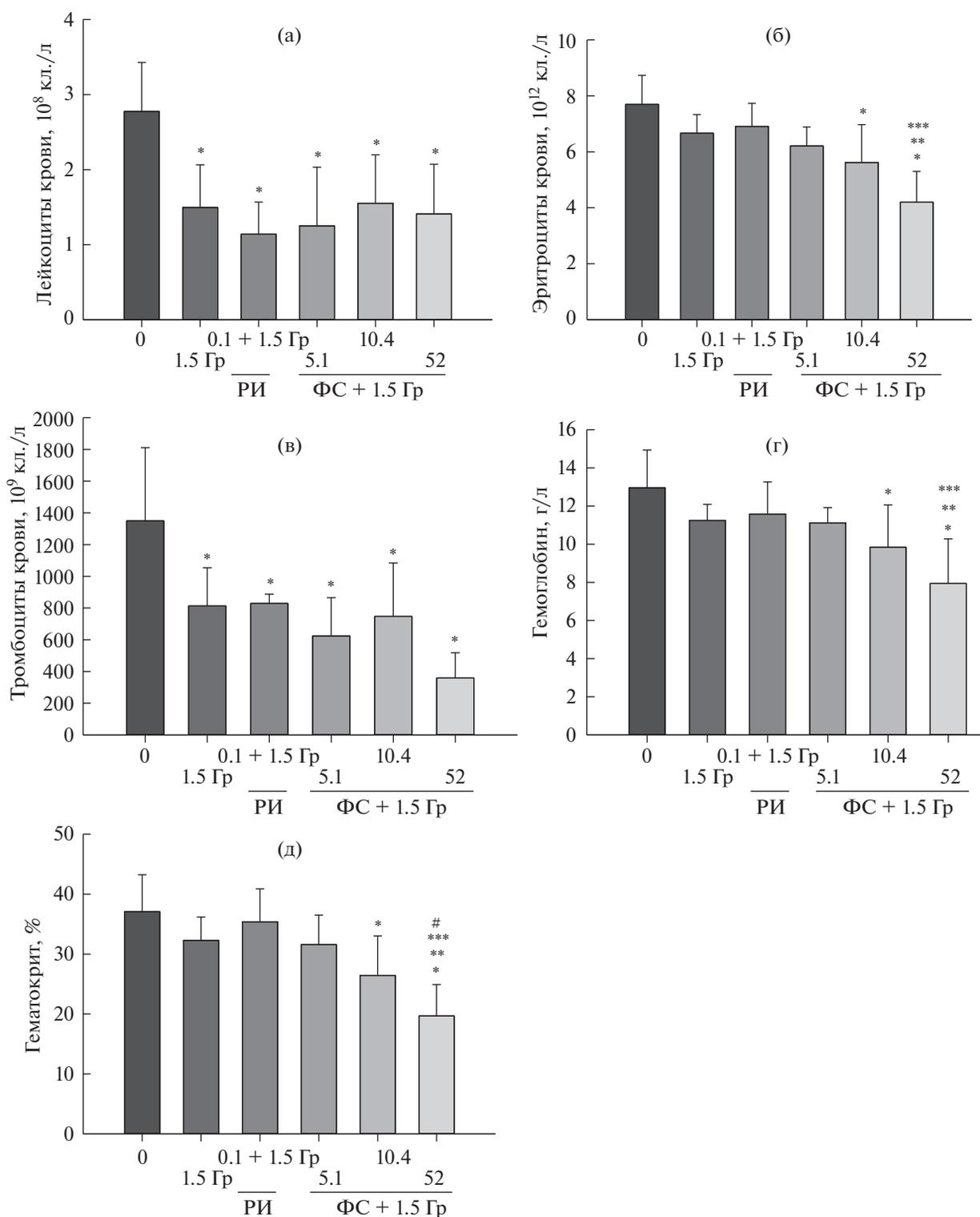
Воздействие адаптирующими дозами низкоинтенсивного ФС лазерного излучения и РИ в дозе 0.1 Гр и затем выявляющей дозой 1.5 Гр достоверно показало, что увеличение дозы облучения от 5.1 до 52 мДж/см<sup>2</sup> (5–50 с) ведет к увеличению повреждающего действия на показатели крови, что максимально наглядно сказалось на снижении концентрации тромбоцитов, эритроцитов, уровня гематокрита и гемоглобина.

В связи с вышеизложенным можно заключить, что исследование показателей крови через 28 ч после выявляющего облучения в дозе 1.5 Гр не способствовало нормализации показателей крови, т.е. развитию АО, что может быть связано с необходимостью более длительного времени для его проявления.



**Рис. 1.** Зависимости индекса массы тимусов у мышей, облученных адаптирующими дозами ФС лазерного излучения и РИ, и затем облученных в дозе 1.5 Гр от величины адаптирующей дозы.

\*—  $p < 0.05$  по сравнению с группой животных, облученных в дозе 1.5 Гр.



**Рис. 2.** Зависимость изменений показателей крови мышей, облученных адаптирующими дозами ФС лазерного излучения и РИ, и затем облученных в дозе 1.5 Гр от величины адаптирующей дозы. Данные представлены как  $M \pm SD$ , уровень значимости: \* –  $p \leq 0.05$  относительно 0, \*\* –  $p \leq 0.05$  относительно 1.5 Гр; \*\*\* –  $p \leq 0.05$  относительно 4 МДж/см<sup>2</sup> + 1.5 Гр; # –  $p \leq 0.05$  относительно ФС лазерного излучения 5.1 мДж/см<sup>2</sup> + 1.5 Гр (ANOVA с тестом Бонферрони  $n = 16$  (контроль, 0),  $n = 10$  (1.5 Гр);  $n = 5$  (все остальные группы)).

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при воздействии на мышей неионизирующим низкоинтенсивным импульс-

ным ФС лазерным излучением в низких дозах наблюдается защитный эффект по тесту радиационный “адаптивный ответ” в том же узком диапазо-

не плотности потока энергии, как и при облучении рентгеновским излучением в дозе 0.1 Гр (4 мДж/см<sup>2</sup>).

В настоящий момент существует большое количество предположений и различных гипотез механизмов активации естественной защиты организма при легких стрессах, вызванных низкими дозами различных физических (ионизирующие и неионизирующие излучения) и химических агентов, главным образом в связи с такими феноменами малых воздействий, как гормезис и АО. Известно, что все они активируются в одной или очень близкой области доз (плотность потока энергии) в зависимости от условий. Что является триггером этих процессов, до сих пор не известно.

Установлено, что действие лазерного и светодиодного излучения низкой интенсивности на биологические объекты приводит к резкому повышению иммунитета, запуску механизма гипериндукции эндогенного интерферона, вызывает дозозависимые изменения продукции цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6), оксида азота и активности естественных киллерных клеток мышей [12–14].

Показаны роль контроля транскрипции и активации процессов репарации ДНК и антиоксидантных систем [15–19], фотоакцепторных молекул цитохром с-оксидазы – терминального фермента электрон-транспортной цепи митохондрий [20], железо- и медь-содержащих ферментов, таких как супероксиддисмутаза, каталаза и церулоплазмин, участвующих в антиокислительных процессах [21], пути выживания и смерти клеток (апоптоза), UPR ответа (эндоплазматический ответ на стресс) и других цитопротективных процессов, включая аутофагию и регуляцию клеточного цикла [22] в отношении феноменов гормезиса и АО при воздействии низкоинтенсивных ионизирующих, лазерных, светодиодных излучений и химических агентов на организм как *in vitro*, так и *in vivo*.

По количеству факторов, запускающих процессы гормезиса и АО, свидетельствующих об активации естественной защиты организма и количеству реакций организма в одной и той же области потоков энергии, нам кажется, что триггерный механизм естественной защиты организма неспецифичен.

Полученные данные позволяют предположить схожий механизм активации естественной защиты организма при облучении малыми дозами как ионизирующего, так и неионизирующего излучений.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по влиянию фемтосекундного лазерного излучения на органы кроветворения при облучении мышей выполнена на базе ФГБУН ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований

по темам ГЗ № 075-00381-21-00 и при частичной поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части облучения ФС лазером.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Мусаев М.М.* // Лазерная медицина. 2016. Т. 20. № 2. С. 16–20.
2. *Khadartsev A.A., Moskvyn S.V.* Laser blood illumination. The main therapeutic techniques. Moscow–Tver, 2018.
3. *Ma L.Y., Rong A., Jiang Y., Deng S.Y.* // Ophthalmology and therapy. 2021. V. 10. P. 137–150.
4. *Москвин С.В.* Основы лазерной терапии. Серия “Эффективная лазерная терапия”. Т. 1. М.-Тверь: ООО “Издательство “Триада”, 2016. 896 с.
5. *Zaichkina S.I., Klokov D.I., Rozanova O.M., et al.* // Genetika. 1998. Т. 34. № 7. С. 1013–1016.
6. *Кузин А.М.* // Радиобиология. 1985. Т. 31. № 1. С. 16–21.
7. *Балакин В.Е., Заичкина С.И., Клоков Д.Ю., и др.* // Доклад РАН. 1998. Т. 363. № 6. С. 843–845.
8. *Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М.* // Радиационная биология. Радиозоология. 2011. Т. 51. № 5. С. 536–541.
9. *Дюкина А.Р., Заичкина С.И., Розанова О.М. и др.* // Мед. физика. 2014. № 4. Т. 64. С. 37–45.
10. *Заичкина С.И., Дюкина А.Р., Розанова О.М. и др.* // Бюл. эксп. биол. и мед. 2016. № 1. Т. 161. С. 32–35.
11. *Schmid W.* // Mutat. Res. 1975. V. 31. № 1. P. 9–15.
12. *Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Скопинов С.А., Дроздов А.Л.* Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии. Вл-ток: Дальнаука, 2002. 157 с.
13. *Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новосёлова Е.Г. и др.* // Медицинская иммунология. 2005. Т. 7. № 2–3. С. 330.
14. *Новосёлова Т.В., Хренов М.О., Лунин С.М. и др.* // Биофизика. 2006. Т. 1. № 51. С. 123–135.
15. *Guo G., Yan-Sanders Y., Lyn-Cook B.D. et al.* // Mol. Cell. Biol. 2003. V. 23. P. 2362–2378.
16. *Murley J.S., Baker K.L., Miller R.C. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 2011. V. 51. P. 1918–1925.
17. *Hou J., Wang F., Kong, P. et al.* // PLoS ONE. 2015. V.10. № 4. e0123316.
18. *Gal P., Stausholm M.B., Kovac I. et al.* // Lasers in Medical Science. 2018. V. 33. № 6. P. 1351–1362.
19. *Kabilan U., Graber T.E., Alain T., Klokov D.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 18. P. 6650.
20. *Elles J.T., Wong-Riley M.T., VerHoeve J. et al.* // Mitochondrion. 2004. V. 4. № 5–6. P. 559–567.
21. *Владимиров Ю.А., Клебанов Г.И., Борисенко Г.Г., Осипов А.Н.* // Биофизика. 2004. Т. 49. № 2. С. 339–350.
22. *Gueguen Y., Bontemps A., Ebrahimian T.G.* // Cell. Mol. Life Sci. 2019. V. 76. P. 1255–1273.

## LOW-INTENSITY FEMTOSECOND RADIATION ACTIVATES THE NATURAL DEFENSES OF MICE *in vivo*

Corresponding Member of the RAS G. R. Ivanitskii<sup>a</sup>, S. I. Zaichkina<sup>a</sup>, A. R. Dyukina<sup>a,#</sup>,  
V. I. Yusupov<sup>b</sup>, S. S. Sorokina<sup>a</sup>, O. M. Rozanova<sup>a</sup>, E. N. Smirnova<sup>a</sup>,  
D. P. Laryskin<sup>a</sup>, N. V. Minaev<sup>b</sup>, and M. M. Potselueva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Photon Technologies Federal Scientific Research Center "Crystallography and Photonics"  
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Troitsk, Russian Federation

#e-mail: dyukina@rambler.ru

The possibility of induction of cytogenetic damage in the bone marrow, changes in the cellularity of lymphoid organs and blood composition in mice irradiated with low-intensity femtosecond laser radiation at a power flux density of 5.1, 10.4, and 52 mJ/cm<sup>2</sup> (0.5 mW for 5, 10, and 50 s) *in vivo* have been shown. Using the test, the radiation adaptive response (4 mJ/cm<sup>2</sup> + 1.5 Gy), it was found that when mice were exposed to femtosecond laser radiation in high doses, the body's natural defenses were activated in the same narrow range of energy flux density as in the case of X-ray irradiation in dose of 0.1 Gy (4 mJ/cm<sup>2</sup>). The data obtained suggest a similar mechanism of activation of the body's natural defenses upon exposure to low doses of both ionizing and non-ionizing radiations.

*Keywords:* femtosecond laser radiation, X-rays, mice, micronuclei, thymus, spleen, blood composition

УДК [577.115+577.115.3]:591.3:597.556.33(985)

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ У МОЛОДИ *LEPTOCLINUS MACULATUS* ИЗ КОНГСФЬОРДА И РИПФЬОРДА АРХ. ШПИЦБЕРГЕН

© 2021 г. Член-корреспондент РАН Н. Н. Немова<sup>1</sup>, С. Н. Пеккоева<sup>1,\*</sup>, В. П. Воронин<sup>1</sup>, Т. Р. Руоколайнен<sup>1</sup>, S. Falk-Petersen<sup>2,3</sup>, J. Berge<sup>3,4,5</sup>, С. А. Мурзина<sup>1</sup>

Поступило 03.08.2021 г.

После доработки 13.08.2021 г.

Принято к публикации 14.08.2021 г.

Проведено сравнительное исследование липидного профиля молоди пятнистого лептоклина *Lepto-clinus maculatus* из фьордов различных доменов (арктическо-бореального Конгсфьорда и высоко-арктического Рипфьорда) акватории арх. Шпицберген летом. Установлено более эффективное накопление липидов у рыб из Конгсфьорда по сравнению с Рипфьордом за счет триацилглицеринов и восков, что связано главным образом с трофическими условиями местообитания (видовой состав, обильность и доступность кормовых объектов). Более высокий уровень эфиров холестерина, чем восков у молоди L1 стадии развития в сравнении с таковым у рыб старшего возраста указывает на ее активное питание преимущественно фитопланктоном. Различия в содержании отдельных классов фосфолипидов могут указывать на адаптивные изменения на уровне биомембран, способствующие поддержанию гомеостаза клетки в ответ на воздействие абиотических факторов среды, а также отражать дополнительное их поступление с пищей на ранних стадиях развития рыбы.

**Ключевые слова:** *Lepto-clinus maculatus*, рыбы, Стихеевые, липиды, Арктика, постэмбриональное развитие

DOI: 10.31857/S2686738921060135

Лептоклин пятнистый *Lepto-clinus maculatus* (Fries, 1838) – арктическо-бореальный вид рыб из семейства Стихеевые (отряд Окунеобразные), который играет важную экологическую роль в трофических цепях арктических экосистем [1, 2]. Лептоклинус является ценным высокоэнергетическим кормовым объектом для многих видов рыб, птиц и даже млекопитающих [3, 4]. Несмотря на небольшие размеры (не более 20 см в длину), он накапливает в мышцах и в липидном мешке, провизорном органе пелагической молоди,

значительное количество липидов – до 40% и до 92% сухой массы, соответственно, преимущественно за счет активного питания зоопланктоном [1, 2, 5, 6]. Жизненный цикл лептоклина выделяется среди других арктических рыб длительным периодом развития молоди (3–5 лет) с последовательной сменой стадий развития от L1 до L5 [3, 5]. В литературе сравнительно немного сведений об изменении липидного профиля арктических видов рыб в процессе их развития [7, 8]. Ранее нами получены данные о качественном и количественном составе липидов мышц и липидного мешка лептоклина пятнистого L1–L5 стадий развития в Конгсфьорде акватории арх. Шпицберген в зимний период [5, 6].

В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ содержания общих липидов и отдельных липидных классов мышц и липидного мешка молоди лептоклина пятнистого в процессе роста и развития в заливах Конгсфьорд и Рипфьорд, различающихся экологическими факторами (температура, ледовый покров, кормовая база и др.), в наиболее продуктивный летний период (август). Сравнительные исследования динамики липидного состава в раннем постэмбриональном развитии представителя арктической

<sup>1</sup> Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

<sup>2</sup> Akvaplan-niva AS, Fram Centre, Tromsø, Norway

<sup>3</sup> UiT The Arctic University of Norway, Department of Arctic and Marine Biology, Tromsø, Norway

<sup>4</sup> The University Centre in Svalbard, Longyearbyen, Norway

<sup>5</sup> Norwegian University of Science and Technology, Centre for Autonomous Marine Operations and Systems, Tromsø, Norway

\*e-mail: pek-svetlana@mail.ru



Рис. 1. Район сбора проб в акватории архипелага Шпицберген (Конгсфьорд (красная метка) и Рипфьорд (желтая метка)).

ихтиофауны лептоклина пятнистого *Leptoclinus maculatus* в фьордах различных доменов имеют особый интерес, так как важны для понимания адаптивных механизмов трансформации вещества и энергии (в данном случае – липидной природы) как в самом организме животного, так и в пищевых цепях арктических экосистем, незаменимым объектом которых он является.

Пробы для анализа были собраны в Конгсфьорде (L1–L4 стадии развития) и Рипфьорде (L1–L5 стадии развития) (рис. 1, табл. 1) акватории архипелага Шпицберген с использованием пелагического трала в ходе научно-исследовательского рейса на научном судне “Helmer Hanssen” (Арктический университет Норвегии). Конгсфьорд и Рипфьорд могут выступать модельными экосистемами для проведения сравнительных исследований, в том числе биохимических, к воздействию на организм гидробионтов биологических и экологических факторов среды. Согласно литературным данным, Конгсфьорд находится под влиянием холодных арктических водных масс, в том числе пресных вод ледников, лежащих в его основании, а также теплых и соленых атлантических вод Западного Шпицбергенского те-

чения, усиливающегося с началом полярного дня [9]. Рипфьорд – высокоарктический неглубокий фьорд, находящийся под сильным влиянием холодных и пресных арктических вод. Рипфьорд может быть покрыт льдом до шести-восьми месяцев в году [10], в то время как Конгсфьорд в последние десятилетия практически не покрывается льдом даже в период полярной ночи [9]. Теплые атлантические подземные воды практически не попадают в Рипфьорд со стороны Северного Ледовитого океана, однако отмечено незначительное влияние атлантических вод в систему фьорда, что приводит к адвекции некоторых бореальных видов, например таких, как веслоногий ракообразный *Calanus finmarchicus*, и вносит изменения в структуру пищевой сети [10, 11].

Оценку липидного профиля проводили по содержанию общих липидов (ОЛ) и их отдельных классов (структурных липидов – фосфолипидов (ФЛ), холестерина (ХС), энергетических липидов – триацилглицеринов (ТАГ), эфиров холестерина (ЭХС) и восков, в том числе впервые получены данные по содержанию моноацилглицеринов (МАГ), диацилглицеринов (ДАГ) и неэтерифицированных (свободных) жирных кислот (СЖК)),

Таблица 1. Гидрологические параметры мест сбора проб в Конгсфьорде и Рипфьорде в летний период

Название фьорда	Координаты	Глубина, м	$t_{\text{воды}}, ^\circ\text{C}$ поверхностный слой	$t_{\text{воды}}, ^\circ\text{C}$ глубина > 200 м	Соленость, psu
Конгсфьорд	78°57" с.ш.; 11°56" в.д	300–360	4.0	1.5	34.8
Рипфьорд	80°17" с.ш.; 22°15" в.д	140–275	5.4	0–0.5	34.7

с использованием метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выполнен анализ содержания отдельных классов фосфолипидов – фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилхолина (ФХ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СФМ). Описание биохимических методов анализа липидов представлено нами ранее [5, 12, 13]. Статистическая обработка данных проведена в открытой программируемой среде R (версия 3.6.1.). Достоверность различий данных определяли с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни [14]. Различия между значениями липидных показателей считали достоверными при  $p \leq 0.05$ . Биохимический анализ выполнен на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра “КарНЦ РАН”.

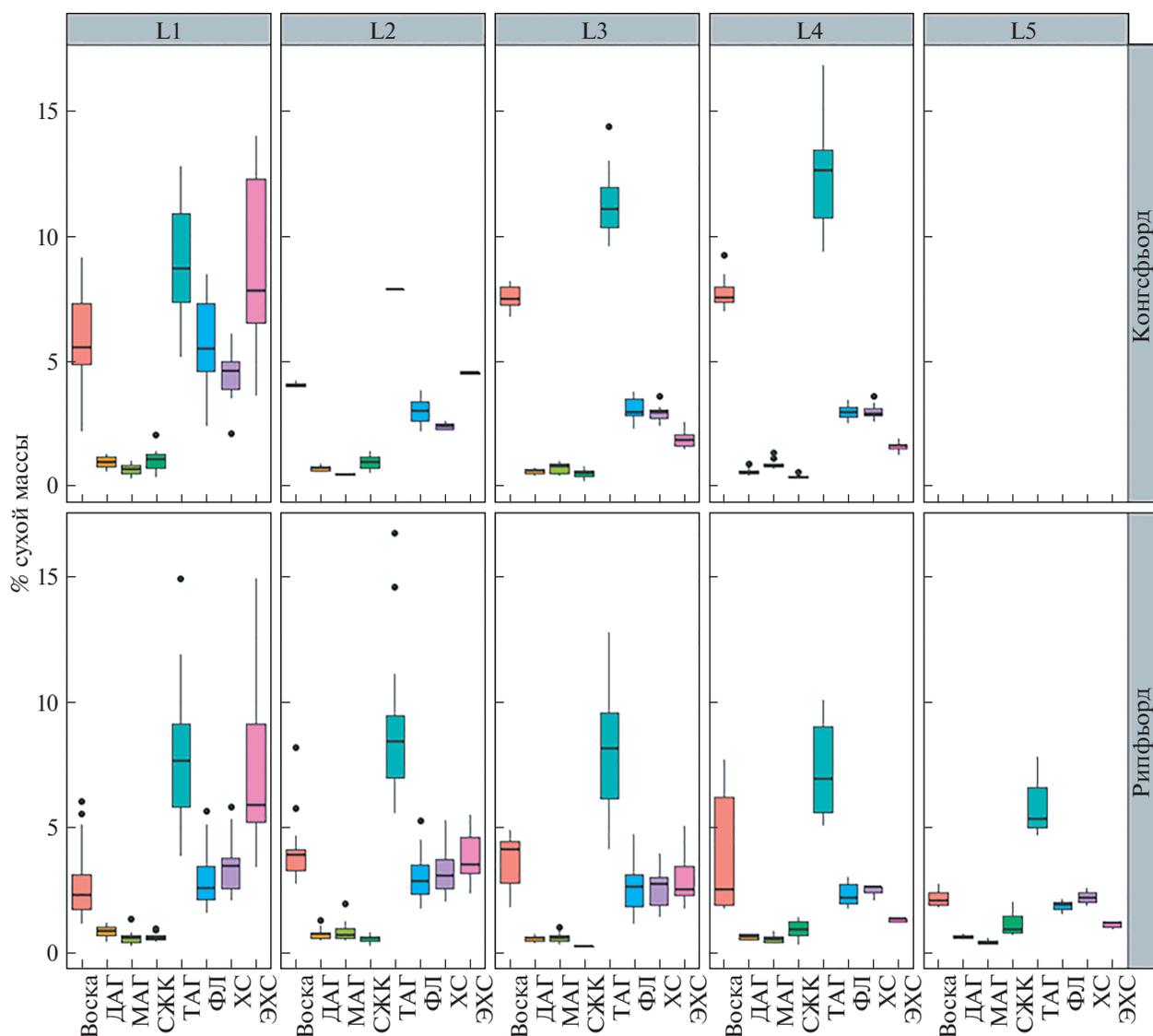
Относительно высокое содержание ОЛ установлено в мышцах молоди пятнистого лептоклина в процессе развития в Конгсфьорде (от 24 до 37% сухой массы) по сравнению с таковым у молоди из высокоарктического Рипфьорда (от 16 до 26%), главным образом, за счет запасных липидов (ТАГ и восков) (рис. 2). Содержание ТАГ, доминирующих в мышцах лептоклина, выше в Конгсфьорде (до 12% сухой массы), чем в Рипфьорде (до 8%). При этом только в Конгсфьорде показано его повышение в процессе роста и развития молоди рыбы от L1 к L4 стадии развития (от 8 до 12% сухой массы). Уровень восков также выше у молоди в Конгсфьорде и повышается от L1 к L4 стадии развития от 6 до 8% сухой массы. Содержание предшественников биосинтеза ТАГ – МАГ, ДАГ, а также СЖК менее или равно 1% на всех стадиях развития в обоих фьордах. В Конгсфьорде показатель ТАГ/ФЛ повышается от 1.8 до 4.1, а в Рипфьорде он варьирует от 2.7 до 3.1 в процессе роста и развития молоди лептоклина. Более эффективное накопление запасных липидов (ТАГ и воска) у рыб из арктическо-бореального Конгсфьорда в процессе роста и развития может быть связано с большим разнообразием кормовых объектов и их доступностью для питания в летний период. Известно, что в Конгсфьорд отличается разнообразием сосуществующих как бореальных, так и арктических видов фито- и зоопланктона, которые отражают изменения распределения и динамики водных масс Западного Шпицбергена [15]. При этом в Рипфьорде, главным образом, доминируют арктические представители планктона, что позволяет рассматривать их в качестве трофического маркера в сравнительных исследованиях пищевых взаимоотношений и сетей в Арктике.

Установлено, что стадия развития L1 достоверно отличается по липидному составу от других. Она характеризуется наибольшим уровнем ОЛ за счет ЭХС и ТАГ. Более высокое содержание ЭХС, чем восков в мышцах личинок L1 стадии развития в исследуемых фьордах по сравнению с таковым у молоди старшего возраста может указывать на онтогенетические особенности ее питания в летний период. Ранее полученные данные жирнокислотного состава личинок L1 стадии показали присутствие в ее питании фитопланктона в отличие от старшей молоди лептоклина, питающейся зоопланктоном [5].

Известно, что представители зоопланктона, веслоногие ракообразные – копеподы, как одни из основных объектов питания личинок рыб, запасают липиды преимущественно в форме восков [16], в то время как в липидном профиле фитопланктона наравне с ТАГ запасаются ЭХС [17], что находит отражение на липидном профиле рыб, питающихся фитопланктоном, и в данном случае, и личинки лептоклина L1.

Молодь L1 стадии развития из Конгсфьорда также выделяется более высоким содержанием ФЛ – 6% сухой массы, чем таковое у рыб в Рипфьорде – 3%. При этом уровень ФЛ у рыб других стадий развития (L2–L5) в обоих фьордах находится в пределах 2.5–3% сухой массы. Личинки L1 стадии развития держатся, главным образом, в поверхностном слое воды [2], и потому, в большей степени подвержены воздействию изменений температурных колебаний, что находит отражение в изменении липидного состава биомембран за счет соотношения ХС и ФЛ [18], как одного из биохимических механизмов компенсаторного ответа организма на воздействие факторов среды. Кроме того, потребность организма рыб в пищевых ФЛ снижается от личинки к ювальной особи [19]. Количество ХС варьирует в процессе развития молоди лептоклина от 2 до 4% в обоих фьордах. Показатель соотношений липидов ХС/ФЛ (коэффициент Дьердии) у рыб в Конгсфьорде изменялся в пределах 0.8–1.0, а в высокоарктическом Рипфьорде был выше на всех стадиях развития лептоклина – 1.0–1.1. Более высокое значение коэффициента Дьердии у рыб в Рипфьорде указывает на изменение физико-химического состояния биомембран в их организме для поддержания гомеостаза внутренней среды при действии более низких температур в глубинных слоях воды. Результатом является усиление вязкости биомембран за счет ХС, что уменьшает ионную проницаемость и изменяет активность мембраносвязанных ферментов.

Установлено, что в мышцах молоди лептоклина на всех стадиях развития преобладает ФХ, в меньшем количестве содержится ФЭА, что подтверждает их высокую значимость в составе мем-



**Рис. 2.** Содержание отдельных классов липидов (% сухой массы) в мышцах молоди лептоклина пятнистого *Leptoclinius maculatus* из Конгсфьорда и Риппфьорда арх. Шпицберген. Обозначения: L1, L2, L3, L4, L5 – исследуемые стадии развития, ФЛ – фосфолипиды, ХС – холестерин, ТАГ – триацилглицерины, ЭХС – эфиры холестерина, МАГ – моноацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины и СЖК – незтерифицированные (свободные) жирные кислоты.

бран, и в том числе метаболическую. Известно, что позвоночные животные холодных вод имеют ограниченные способности биосинтеза ФЛ и поэтому получают их главным образом при питании [19]. Уровень ФХ у лептоклина в Конгсфьорде варьирует от 2.3 до 4.6% сухой массы и достоверно более высокий, чем у молоди в Риппфьорде. Наибольшее содержание ФХ и ФЭА показано для L1 стадии развития лептоклина, что необходимо для обеспечения эффективного роста и оптимального физиологического состояния рыб в раннем онтогенезе [20]. Содержание других классов фосфолипидов (ФИ, ФС, СФМ, ЛФХ) в мышцах молоди лептоклина незначительное (меньше или равно 0.1% сухой массы). Однако установленные

достоверные различия их уровня указывают на их роль в организме не только как структурных компонентов, но и как вторичных мессенджеров во многих клеточных процессах, в том числе компенсаторного характера в ответ на изменение внешних факторов среды.

Сравнительное исследование содержания ОЛ и их классов в липидном мешке лептоклина пятнистого (L3, L4 стадий развития) показало отсутствие значимых различий в процессе его раннего постэмбрионального развития в Конгсфьорде и Риппфьорде. Полученные данные указывают на то, что липидный мешок сохраняет свое основное функциональное значение (прежде всего как энергетическое депо, а также – обеспечение пла-

вучести) [2, 5] в различных условиях Арктики. Несмотря на различающиеся условия среды в исследованных фьордах, ключевой является стратегия накопления липидов в липидном мешке молодой лептоклина, что, в том числе, обеспечивает выживание и развитие личинок в зимний период. Уровень общих липидов на L3, L4 стадиях развития у молоди лептоклина из Конгсфьорда составляет – 85 и 87% сухой массы соответственно по стадиям, а в полярную ночь – 76 и 85% [6]. При этом активное питание в летний и далее в осенний периоды способствует запасанию ТАГ в липидном мешке личинок рыбы к зиме, так как уровень этого класса липидов выше в полярную ночь, чем летом (69 и 55% сухой массы соответственно на L3 и L4 стадиях развития в полярную ночь и 43 и 44% сухой массы соответственно по стадиям в летний период) [6].

Так, в работе впервые представлены данные по содержанию ОЛ и отдельных классов липидов, группы ведущих компонентов липидного метаболизма (ФЛ, МАГ, ДАГ, ТАГ, СЖК, ХС, ЭХС, восков), в мышцах и в липидном мешке лептоклина пятнистого в процессе раннего постэмбрионального развития во фьордах различных доменов (арктическо-бореальном Конгсфьорде и высокоарктическом Рипфьорде) акватории арх. Шпицберген в летний период. Установлено более эффективное накопление ОЛ за счет ТАГ и восков в мышцах молоди лептоклина из Конгсфьорда по сравнению с Рипфьордом, при этом в липидном мешке отмечено поддержание определенного уровня как ОЛ, так и других исследуемых показателей, что демонстрирует единую физиолого-биохимическую стратегию жизнедеятельности вида в условиях Арктики. Полученные данные позволяют предположить, что различия в содержании запасных липидов в мышцах молоди лептоклина связаны прежде всего с трофическими условиями (присутствие арктических и атлантических видов зоопланктона в Конгсфьорде). Впервые показан более высокий уровень ЭХС, чем восков на L1 стадии развития лептоклина, что связано с ее активным питанием (преимущественно фитопланктоном) в продуктивный летний период. Различия в содержании отдельных классов структурных ФЛ могут указывать на адаптивные изменения на уровне биомембран для поддержания гомеостаза клетки в ответ на воздействие абиотических факторов среды, а также могут отражать дополнительное поступление при питании на ранних стадиях развития рыбы.

Таким образом, установленные различия в содержании классов запасных липидов в мышцах молоди лептоклина пятнистого отражают особенности его питания в процессе развития в Конгсфьорде и высокоарктическом Рипфьорде арх. Шпицберген в летний период. При этом выявленные вариации на уровне структурных ли-

пидов связаны с поддержанием надлежащего физико-химического состояния биомембран, обеспечивающего оптимальную работу мембраносвязанных ферментов и их комплексов в соответствующих температурных условиях местообитания молоди.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично выполнена в рамках государственного задания № 0218-2019-0076; научное исследование проведено при финансовой поддержке Гранта Президента РФ МК-2188.2020.4 (2020–2021).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Falk-Petersen S., Falk-Petersen I.-B., Sargent J.R.* Structure and function of an unusual lipid storage organ in the Arctic fish *Lumpenus maculatus* Fries, 1838 // *Sarsia*. 1986. № 71. P. 1–6.
2. *Мурзина С.А.* Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в биохимических адаптациях люмпена пятнистого *Leptoclinus maculatus* F. северо-западного побережья о. Шпицберген: Дисс. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2010. 184 с.
3. *Meyer Ottesen C.A., Haakon H., Schou Christiansen J., et al.* Early life history of the daubed shanny (Teleostei: *Leptoclinus maculatus*) in Svalbard waters // *Marine Biodiversity*. 2011. V. 41. № 3. P. 383–394.
4. *Murзина S.A., Sokolov S.G., Pekkoeva S.N., et al.* First data on the parasite fauna of daubed shanny *Leptoclinus maculatus* (Fries 1838) (Actinopterygii, Perciformes: Stichaeidae) in Svalbard waters // *Polar Biology*. 2019. V. 42. № 4. P. 831–834.
5. *Pekkoeva S.N., Murзина S.A., Nefedova Z.A., et al.* Ecological role of lipids and fatty acids in the early postembryonic development of daubed shanny, *Leptoclinus maculatus* (Fries, 1838) from Kongsfjorden, West Spitsbergen in winter // *Rus. J. of Ecology*. 2017. V. 48. № 3. P. 240–244.
6. *Pekkoeva S.N., Murзина S.A., Nefedova Z.A., et al.* Fatty acid composition of the postlarval daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*) during the polar night // *Polar Biology*. 2020. V. 43. № 6. P. 657–664.
7. *Tocher D.R.* Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish // *Aquaculture Research*. 2010. V. 41. № 5. P. 717–732.
8. *Copeman L., Spencer M., Heintz R., et al.* Ontogenetic patterns in lipid and fatty acid biomarkers of juvenile polar cod (*Boreogadus saida*) and saffron cod (*Eleginus*

- gracilis*) from across the Alaska Arctic // *Polar Biol.* 2020. V. 43. P. 1121–1140.
9. Cottier F. Water mass modification in an Arctic fjord through cross-shelf exchange: the seasonal hydrography of Kongsfjorden, Svalbard // *J. Geophys. Res. Oceans.* 2005. V. 110. P.12005.
  10. Wang C., Shi L., Gerland S., et al. Spring sea-ice evolution in Rijpfjorden (80 N), Svalbard, from in situ measurements and ice mass-balance buoy (IMB) data. *Annals of Glaciology.* 2013. V. 54. № 62. P. 253–260.
  11. Willis K., Cottier F.R., Kwasniewski S., et al. The influence of advection on zooplankton community composition in an Arctic fjord (Kongsfjorden, Svalbard) // *J. Marine Systems.* 2006. V. 6. P. 39–54.
  12. Мурзина С.А., Нефедова З.А., Руоколайнен Т.Р., и др. Динамика содержания липидов в процессе раннего развития пресноводного лосося *Salmo salar* L. // *Онтогенез.* 2009. Т. 40. № 3. С. 208–214.
  13. Воронин В.П., Мурзина С.А., Нефедова З.А., и др. Сравнительно-видовая характеристика липидов и их динамика в процессе эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.) // *Онтогенез.* 2021. Т. 52. № 2. С. 108–119.
  14. Кабаков П.И. R в действии. Анализ и визуализация данных в программе R / Пер. с англ. Полины А. Волковой. М.: ДМК Пресс, 2014.
  15. Kwasniewski S., Hop H., Falk-Petersen S., et al. Distribution of *Calanus* species in Kongsfjorden, a glacial fjord in Svalbard // *J. Plankton Res.* 2003. V. 25. P. 1–20.
  16. Lee R., Hagen W., Kattner G. Lipid storage in marine zooplankton // *Marine ecology Progress Series.* 2006. № 307. P. 273–306.
  17. Henderson R.J., Tocher D.R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish // *Progr. Lipid Res.* 1987. V. 26. № 4. P. 281–347.
  18. Финагин Л.К. Обмен холестерина и его регуляции. Киев, 1980.
  19. Tocher D.R., Bendiksen E., Campbell P., et al. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of Teleost fish // *Aquaculture.* 2008. V. 280. P. 21–34.
  20. Kanazawa A., Teshima S.-I., Sakamoto M. Effect of dietary lipids, fatty acids, and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae // *Aquaculture.* 1985. V. 50. P. 39–49.

## COMPARATIVE STUDY OF LIPID CONTENT IN *LEPTOCLINUS MACULATUS* POSTLARVAE FROM KONGSFJORD AND RJIPIFJORD, SPITSBERGEN

Corresponding Member of the RAS N. N. Nemova<sup>a</sup>, S. N. Pekkoeva<sup>a, #</sup>, V. P. Voronin<sup>a</sup>, T. R. Ruokolainen<sup>a</sup>, S. Falk-Petersen<sup>b, c</sup>, J. Berge<sup>c, d, e</sup>, and S. A. Murzina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Akvaplan-niva AS, Fram Centre, Tromso, Norway

<sup>c</sup> UiT The Arctic University of Norway, Department of Arctic and Marine Biology, Tromso, Norway

<sup>d</sup> The University Centre in Svalbard, Longyearbyen, Norway

<sup>e</sup> Norwegian University of Science and Technology, Centre for Autonomous Marine Operations and Systems, Tromso, Norway

<sup>#</sup>e-mail: pek-svetlana@mail.ru

A comparative study of lipid profile of the daubed shanny postlarvae *Leptoclinus maculatus* from fjords of different domains (arctic-boreal Kongsfjord and high Arctic Rjipfjord) of Spitsbergen archipelago in summer was performed. A higher level of storage of lipids in fishes from Kongsfjord compared to Rjipfjord due to triacylglycerols and wax esters was established. These differences assumed mainly related to trophic conditions of the habitat (species composition, abundance, and availability of food items). Determined higher level of cholesterol esters than wax esters at L1 stage of development of the daubed shanny postlarvae compared to older fish pointed to his active feeding mainly on phytoplankton. Differences in the content of individual classes of phospholipids may indicate adaptive changes at the level of biomembranes, contributing to the maintenance of cell homeostasis in response to abiotic environmental factors, and reflect their additional intake with food at the early stages of fish development.

**Keywords:** *Leptoclinus maculatus*, fishes, Stichaeidae, lipids, Arctic, postembryonic development

УДК 612.017:612.018

## ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. С. А. Заморина<sup>1,2,\*</sup>, К. Ю. Шардина<sup>1</sup>, В. П. Тимганова<sup>1</sup>, М. С. Бочкова<sup>1,2</sup>, С. В. Ужвиюк<sup>1</sup>, М. Б. Раев<sup>1,2</sup>, академик РАН В. А. Черешнев<sup>1,2</sup>

Поступило 30.04.2021 г.

После доработки 06.09.2021 г.

Принято к публикации 07.09.2021 г.

Изучали влияние рекомбинантного альфа-фетопротеина (АФП) на дифференцировку миелоидных супрессорных клеток человека (MDSC) в условиях культивирования *in vitro* в присутствии цитокинов IL-6 (10 нг/мл) и GM-CSF (10 нг/мл). Установлено, что АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл повышал количество MDSC (CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-low</sup>CD11b<sup>+</sup>) в культуре, при анализе субпопуляций MDSC было показано, что повышение происходило за счет моноцитарных M-MDSC (HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>). Не выявлено модулирующего эффекта АФП на гранулоцитарные PMN-MDSC (HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>+</sup>). Таким образом, впервые продемонстрированы эффекты рекомбинантного АФП в отношении дифференцировки MDSC.

**Ключевые слова:** альфа-фетопротеин (АФП), иммунная толерантность, миелоидные супрессорные клетки (МС), беременность

**DOI:** 10.31857/S2686738921060184

Во время беременности иммунная система матери подвергается аллоиммунизации фетоплацентарными антигенами. В результате формируется динамическое состояние иммунной толерантности, в поддержании которого важную роль играют белки, ассоциированные с беременностью. Альфа-фетопротеин (АФП) — одноцепочечный гликопротеин (Mг 68–75 кДа, 3–5% углеводов), который синтезируется в период раннего развития эмбриона в желточном мешке, а затем в печени и желудочно-кишечном тракте плода. Во время беременности концентрация АФП в крови растет, достигая значений 150–250 МЕ/мл, после родов его уровень резко снижается [1].

На данный момент времени роль АФП в регуляции факторов иммунной толерантности в период беременности находится в стадии изучения [2]. Так, известно, что АФП способен регулировать дифференцировку и функциональную активность таких значимых субпопуляций клеток иммунной системы, как Т-регуляторные лимфоциты (Treg), ИЛ-17-продуцирующие Т-клетки

(Th17), Т-клетки иммунной памяти, NK-клетки [цит. по 3]. Однако до сих пор не исследована роль АФП в регуляции ключевой популяции клеток, отвечающей за иммуносупрессию — миелоидных супрессорных клеток (myeloid-derived suppressor cells, MDSC). MDSC — гетерогенная популяция незрелых клеток миелоидного происхождения, которые при патологических состояниях приобретают супрессорный фенотип, подавляющий иммунный ответ [4]. Миелоидные супрессорные клетки в первую очередь ассоциированы с онкологическими процессами: так, известно, что ликвидация MDSC из опухолевого микроокружения повышает выживаемость онкологических больных [5]. С момента открытия MDSC накопилось большое количество данных о фенотипе, функциях и механизмах действия MDSC, в том числе стало известно, что уровень MDSC увеличивается при многих патологических состояниях, таких как травматический шок, сепсис, аутоиммунные заболевания, воспаление и даже старение [6]. С 2014 г. известно, что уровень MDSC повышается также и во время беременности [7], а затем был идентифицирован рецептор для АФП (AFPR) на этих клетках [8].

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния АФП на дифференцировку MDSC человека в условиях *in vitro*.

В результате проведенных исследований впервые показано, что АФП в физиологических кон-

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>2</sup> Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

\*e-mail: mantissa7@mail.ru

центрациях участвует в регуляции дифференцировки MDSC, повышая количество этих клеток. Обнаруженные нами эффекты свидетельствуют о том, что АФП может участвовать в формировании периферической иммунной толерантности матери к полуаллогенному эмбриону.

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на используемую экспериментальную схему получено разрешение Этического комитета “ИЭГМ УрО РАН” (IRB00010009) от 30.08.2019. В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) доноров, которыми являлись здоровые небеременные женщины репродуктивного возраста ( $n = 6$ ). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности фикола–верографина ( $d = 1.077$  г/см<sup>3</sup>). Монокультуры CD33<sup>+</sup>-клеток получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS<sup>®</sup> (“Miltenyi Biotec”, Германия) из суспензии МПК. Для оценки влияния АФП на дифференцировку MDSC использовали экспериментальную модель, основанную на индукции миелоидных клеток периферической крови (CD33<sup>+</sup>) в фенотип MDSC при помощи цитокинов ИЛ-6 и ГМ-КСФ, где ИЛ-6 создает провоспалительный цитокиновый фон, а ГМ-КСФ является ростовым сигналом для миелоидных клеток [9]. Таким образом, CD33<sup>+</sup>-клетки культивировали в 96-луночном планшете в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в течение 7 сут (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в полной питательной среде (RPMI-1640, 10% FBS, 10 мМ Непес, 2 мМ L-глутамин (“ICN Ph.”, США) с добавлением пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, “BI”, Израиль) и рекомбинантных цитокинов ИЛ-6 (10 нг/мл) и ГМ-КСФ (10 нг/мл) (“Miltenyi Biotec”, Германия). Замена среды в культуре производилась на 4-е сутки, тогда же вносили АФП. В работе использовали рекомбинантный препарат АФП (“Prospec”, Израиль) в физиологических концентрациях (10, 50 и 100 МЕ/мл [10]). После этого клетки культивировались 3 сут, после чего их собирали при помощи аккумулята согласно рекомендациям производителя (“Capricorn Scientific”, Германия). По окончании инкубирования производили окрашивание клеток на жизнеспособность суправитальным красителем Zombie Aqua (ZA) (“Biolegend”, США) согласно протоколу производителя. Процент живых (ZA<sup>-</sup>) клеток в культурах колебался в пределах 85.5–92.1%, достоверных различий между культурами выявлено не было.

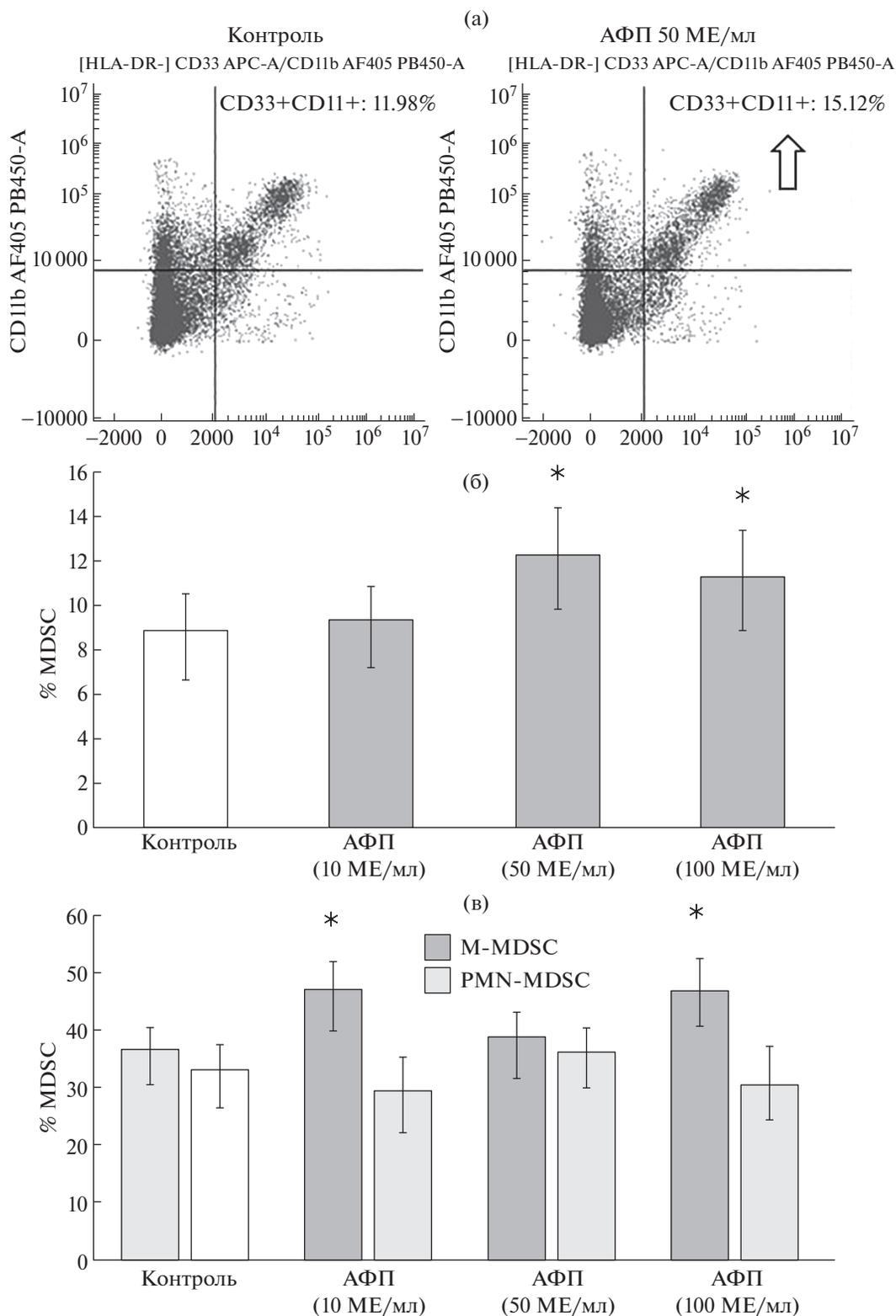
После стандартных процедур отмывок клетки окрашивали антителами для цитофлуориметрического определения процента MDSC (HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) (рис. 1а), а также моноци-

тарных M-MDSC (HLA-DR<sup>-low</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>) и гранулоцитарных PMN-MDSC (HLA<sup>-low</sup>DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>+</sup>). Окрашивание производили антителами к HLA-DR-Alexa Fluor 750, CD33-APC, CD11b-Alexa Fluor 405, CD66b-PE и CD14-PerCP (все “R&D Systems”, США) по стандартной методике поверхностного окрашивания. Определение процента субпопуляций клеток (MDSC, M-MDSC, PMN-MDSC) проводили на цитометре CytoFLEX S (“Beckman Coulter”, США). Файлы данных проточной цитометрии были проанализированы с помощью программы “KALUZA Analysis Software”. Статистическую обработку данных осуществляли в GraphPad Prism 8, с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Для оценки эффектов АФП на дифференцировку MDSC использовали индукционную модель, в которой присутствие провоспалительного цитокина ИЛ-6 создает провоспалительный цитокиновый фон, а ГМ-КСФ является ростовым сигналом для миелоидных клеток. Показано, что самостоятельный эффект индукции клеток цитокинами заключался в достоверном повышении уровня MDSC (с  $1.54 \pm 0.97$  до  $8.88 \pm 2.63$ ;  $n = 6$ ), что свидетельствует об адекватности выбранной экспериментальной модели.

Установлено, что рекомбинантный АФП в концентрациях 50 и 100 МЕ/мл повышал уровень MDSC человека в культуре миелоидных клеток человека (рис. 1а, 1б). При анализе субпопуляционного состава MDSC было показано, что АФП повышал уровень M-MDSC (10 и 100 МЕ/мл), не влияя на количество PMN-MDSC (рис. 1в). Данный результат можно интерпретировать как фетопротективный эффект АФП, поскольку повышение уровня MDSC в период беременности ассоциируется с подавлением иммунного ответа на отцовские антигены.

Известно, что уровень PMN-MDSC увеличивается в периферической крови здоровых беременных женщин на всех стадиях беременности по сравнению с небеременными, тогда как число M-MDSC остается без изменений [7]. Плацентарные PMN-MDSC эффективно подавляют Т-клеточный ответ, одновременно поляризуя CD4<sup>+</sup>-лимфоциты в фенотип Th2 [11]. Вероятно, PMN-MDSC играют важную роль в индуцировании и поддержании толерантности к антигенам плода, что позволяет рассматривать их как перспективную мишень терапевтического манипулирования при осложнениях беременности. Довольно интересно, что в нашем исследовании рекомбинантный АФП не влиял на дифференцировку PMN-MDSC, но повышал уровень M-MDSC. По-видимому, это связано со структурными отличиями нативного и рекомбинантного АФП. В ситуации *in vivo* фетальный АФП в материнском кровотоке



**Рис. 1.** Влияние АФП на уровень MDSC в культурах изолированных миелоидных клеток (CD33<sup>+</sup>), индуцированных цитокинами IL-6 и GM-CSF (*n* = 6; M(Q1–Q3)).

(а) Уровень MDSC (CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) от HLA-DR<sup>-low</sup> клеток в культуре на примере одного эксперимента, представлены контроль и проба АФП 50 МЕ/мл, (б) влияние АФП на общий уровень MDSC (CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) в культуре, (в) влияние АФП на уровень M-MDSC и PMN-MDSC в культуре.

Примечание: \* – достоверные (*p* < 0.05) по U-критерию Манна–Уитни различия с контролем.

становится трансформированным АФП (tAFP). Особенность этой формы заключается в том, что вследствие частичного разворачивания нативной полноразмерной молекулы появляется скрытый пептидный эпитоп, состоящий из третьего домена АФП (34 а/к) [12]. По-видимому, нативный АФП регулирует прежде всего полиморфноядерные MDSC, в то время как рекомбинантная форма АФП больше взаимодействует с моноцитарными MDSC.

Известно, что рекомбинантный АФП, конъюгированный с токсинами, способен вызывать гибель MDSC [13], что является платформой для создания новых противоопухолевых препаратов. Однако до сих пор не был исследован самостоятельный эффект АФП на дифференцировку MDSC. Возможно, повышение уровня MDSC в культурах с рекомбинантным АФП можно рассматривать как позитивный иммунофармакологический эффект для его применения в терапии аутоиммунных заболеваний. В целом мы впервые продемонстрировали стимулирующее влияние рекомбинантного АФП на процесс дифференцировки MDSC человека в условиях *in vitro*.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-415-590001; в работе было использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УРО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terentiev A.A., Moldogazieva N.T. Alpha-fetoprotein: A renaissance // *Tumor Biol.* 2013. V. 34. P. 2075–2091.
2. Schumacher A., Costa S.D., Zenclussen A.C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy // *Front. Immunol.* 2014.
3. Pak V.N. Alpha-fetoprotein and Its Receptor in Fixing the Cancer Brakes / Cambridge Scholars Publishing, 2021.
4. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. № 9. P. 162–174.
5. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid derived suppressor cells: linking inflammation and cancer // *J. Immunol.* 2009. V. 182 (8). P. 4499–4506.
6. Veglia F., Sanseviero E., Gabrilovich D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity // *Nat. Rev. Immunol.* 2021 Epub ahead of print.
7. Kostlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marme A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C. F., Gille C. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses // *Eur. J. Immunol.* 2014. № 44 (9). P. 2582–2591.
8. Belyaev N.N., Abdolla N., Perfilyeva Y.V., Ostapchuk Y.O., Krasnoshtanov V.K., Kali A., Tleulieva R. Daunorubicin conjugated with alpha-fetoprotein selectively eliminates myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and inhibits experimental tumor growth. // *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Jan; V. 67. № 1. P. 101–111.
9. Lechner M.G., Liebertz D.J., Epstein A.L. Characterization of cytokine-induced myeloid derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells // *J. Immunol.* 2010. V. 185. № 4. P. 2273–84.
10. Gagnon A., Wilson R.D., Audibert F., Allen V.M., Blight C., Brock J.A., Desilets V.A., Johnson J.A., Langlois S., Summers A., Wyatt P. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes // *J. of Obstetrics and Gynaecology Canada.* 2008. V. 30. P. 918–932.
11. Köstlin N., Hofstädter K., Ostermeir A.L., Spring B., Leiber A., Haen S., Abele H., Bauer P., Pollheimer J., Hartl D., Poets C.F., Gille C. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells accumulate in human placenta and polarize toward a Th2 phenotype // *Journal of Immunology.* 2016. № 196 (3). P. 1132–1145.
12. González-Bugatto F., Foncubierta E., Bailén Mde L., Illanes S., Hervías-Vivancos B., Bartha J.L. Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2009. V. 35. № 2. P. 271–276.
13. Pak V.N. Selective targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients through AFP-binding receptors // *Future Sci OA.* 2018. V. 5. (1) FSO321. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2018-0029>

## EFFECT OF ALPHA-FETOPROTEIN ON THE DIFFERENTIATION OF MYELOID SUPPRESSOR CELLS

S. A. Zamorina<sup>a,b,#</sup>, K. Yu. Shardina<sup>a</sup>, V. P. Timganova<sup>a</sup>, M. S. Bochkova<sup>a,b</sup>, S. V. Uzhviyuk<sup>a</sup>, M. B. Rayev<sup>a,b</sup>, and Academician of the RAS V. A. Chereshev<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Perm State National Research University, Perm, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: mantissa7@mail.ru

The effect of recombinant alpha-fetoprotein (AFP) on human myeloid suppressor cell (MDSC) differentiation *in vitro* in the presence of IL-6 (10 ng/mL) and GM-CSF (10 ng/mL) cytokines was investigated. It was found that AFP at concentrations of 50 and 100 IU/mL increased the amount of MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>/low-CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) in culture. Analysis of MDSC subpopulations revealed that the increase was due to monocytic M-MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>/low-CD33<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD66b<sup>-</sup>) but not granulocytic PMN-MDSC (HLA-DR<sup>-</sup>/low-CD33<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD66b<sup>+</sup>). This is the first time that the effects of recombinant AFP on MDSC differentiation have been demonstrated.

**Keywords:** alpha-fetoprotein (AFP), immune tolerance, myeloid suppressor cells (MDSC), pregnancy

УДК 571.27: 54.06

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ JURKAT В СИСТЕМЕ CELL-IQ

© 2021 г. С. А. Заморина<sup>1,\*</sup>, П. В. Храмцов<sup>1</sup>, М. Б. Раев<sup>1</sup>, В. П. Тимганова<sup>1</sup>, М. С. Бочкова<sup>1</sup>, А. И. Нечаев<sup>1,2</sup>, Е. О. Шунькин<sup>3</sup>, О. Г. Хазиахматова<sup>1,3</sup>, В. В. Малащенко<sup>3</sup>, Л. С. Литвинова<sup>3</sup>

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым

Поступило 13.05.2021 г.

После доработки 06.09.2021 г.

Принято к публикации 07.09.2021 г.

В последние годы материалы на основе оксида графена (ОГ) активно изучаются на предмет использования в биомедицине. Целью нашего исследования было изучение прироста клеточной массы и жизнеспособности Т-клеток опухолевой линии Jurkat при 24-часовом контакте с наночастицами ОГ системе прижизненного наблюдения Cell-IQ. В работе применяли наночастицы разного размера, покрытые линейным или разветвленным полиэтиленгликолем (ПЭГ) в концентрациях 5 и 25 мкг/мл. Впервые показано, что в результате прямого контакта с наночастицами ОГ более, чем в два раза снижался прирост клеточной массы в точках визуализации, независимо от размерности и концентрации наночастиц. Помимо этого, на 5–9% снижалось число живых клеток в культуре после суточного мониторинга. Таким образом, установлено, что наночастицы ОГ, покрытые ПЭГ, подавляют пролиферацию и жизнеспособность Т-лимфоцитов клеточной линии Jurkat.

**Ключевые слова:** наночастицы оксида графена, полиэтиленгликоль, жизнеспособность, клеточная масса, опухолевая линия Jurkat, система наблюдения CELL-IQ

**DOI:** 10.31857/S2686738921060196

### ВВЕДЕНИЕ

Препараты на основе графена являются одним из самых перспективных материалов в биомедицине. В биологических и медицинских исследованиях преимущественно применяются окисленные формы графена, а именно оксид графена (ОГ) [1, 2]. Очевидно, что постоянно растущий спектр применения препаратов на основе графена в *in vivo* терапии и диагностике диктует необходимость всесторонней оценки его биосовместимости. Известно, что взаимодействие препаратов на основе графена с клетками живых организмов зачастую приводит к нарушению/изменению их активности либо гибели [3, 4]. На настоящий момент известно, что графен и его производные, в

том числе ОГ, индуцируют апоптоз, некроз, или аутофагию клеток [5]. В то же время покрытие наночастиц биосовместимыми полимерами, из которых самым актуальным является полиэтиленгликоль (ПЭГ), существенно снижает цитотоксичность ОГ [6].

Очевидно, что клетки иммунной системы являются первой линией контакта с наноматериалами, индуцируя возникновение возможных побочных реакций. Учитывая тот факт, что применение препаратов на основе оксида графена предполагает модулирование функциональной активности клеток иммунной системы, в частности, при их использовании в качестве адьювантов, антибактериальных и противоопухолевых препаратов, необходимо полноценно исследовать взаимодействие ОГ с клетками иммунной системы. В данный момент информация о взаимодействии оксида графена с клетками иммунной системы разнородна и носит не системный характер [7, 8].

Таким образом, целью исследования являлось изучение взаимодействия наночастиц ОГ с клетками линии Jurkat в системе прижизненного наблюдения Cell-IQ. Итогом наблюдений стала оценка жизнеспособности клеток и прироста клеточной массы Т-клеток линии Jurkat в присут-

<sup>1</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

<sup>2</sup> Институт технической химии УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

<sup>3</sup> Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

\*e-mail: zamorina.sa@gmail.com

ствии наночастиц ОГ разного размера, покрытых линейным или разветвленным ПЭГ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на работу было получено разрешение этического комитета “ИЭГМ УрО РАН” (IRB00010009) от 30.08.2019.

В работе использовались наночастицы ОГ размерами 100–200 нм (ОГ-S) и 1–5 мкм (ОГ-L) (“Ossila Ltd”, Великобритания), которые покрывались линейным (ПЭГ) и разветвленным (ПЭГ8) полиэтиленгликолем. Для процедур функционализации использовалась монохлоруксусная кислота (99%), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC, 98%), N-гидроксисукцинимид (NHS, >98%), 8-аgm-полиэтиленгликоль-(трипентаэритритное ядро)-NH<sub>2</sub> (ПЭГ8-NH<sub>2</sub>, Mw 10000 г/моль), метоксиполиэтиленгликоль амин mПЭГ-NH<sub>2</sub> (MW 5000 г/моль), производства “Alfa Aesar”, США. Все реактивы использовались без дополнительной очистки.

Модификация наночастиц ОГ линейным ПЭГ и разветвленным ПЭГ8 осуществлялась методом ковалентной пришивки аминогрупп к поверхностным карбоксильным группами ОГ с образованием амидной связи. Для этого растворы ОГ-L и ОГ-S (2 мг/мл) подвергались ультразвуковой обработке в течение 30 мин мощностью 25 и 150 Вт соответственно. Карбоксилирование ОГ проводилось в щелочной среде (NaOH) в присутствии Cl-CH<sub>2</sub>-COOH при ультразвуковой обработке в течение 1 ч. Полученный раствор ОГ-COOH нейтрализован многократной промывкой деионизованной водой. Далее к суспензии ОГ-COOH (pH 5, 6) при ультразвуковой обработке в течение 5 мин добавляли NHS (10 ммоль/л), EDC (4 ммоль/л) и ПЭГ-NH<sub>2</sub> (или 8ПЭГ-NH<sub>2</sub>) (2 мг/мл), для окончания реакции ковалентной пришивки PEG раствор оставляли при комнатной температуре на сутки. Полученные суспензии ОГ-ПЭГ или ОГ-8ПЭГ очищались методом диализа и трехкратной промывкой с центрифугированием этиловым спиртом с финальной сушкой при 65°C под вакуумом [9].

Изменение состава и структуры ОГ при его модификации полиэтиленгликолями характеризовали методами ИК-Фурье и УФ-вид спектроскопиями. ИК-Фурье спектры исходных и модифицированных ОГ были получены на спектрометре IFS 66/S Bruker в области 400–4000 см<sup>-1</sup>. Образцы для анализа готовили прессованием таблеток с KBr (2 мг образца к 299 мг KBr). Спектры поглощения растворов исходного и модифицированных ОГ были определены на двухлучевом спек-

трофотометре UV 2600 в диапазоне длин волн 200–900 нм. Распределение исходного и модифицированных наночастиц ОГ по размеру, а также их дзета-потенциал в водных растворах определяли методом динамического светорассеяния на приборе ZetaPALS Brookhaven. Определение степени покрытия ОГ линейным ПЭГ и разветвленным ПЭГ8 проводили методом термогравиметрического анализа (ТГА). Термогравиметрический анализ исходных и модифицированных ОГ был проведен на совмещенном ТГ-ДСК приборе TGA/DSC 1 Mettler-Toledo при скорости нагревания 10 К/мин в диапазоне температур 30–900°C в инертной атмосфере аргона.

Для исследования *in vitro* использовали иммортализованную клеточную линию Jurkat 5332 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) в конечной концентрации 1 млн жизнеспособных клеток на 1 мл питательной среды.

Клетки ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI 1640, 10% бычьего сывороточного альбумина (“Sigma-Aldrich”) и 0.3 мг/мл L-глутамина (“Sigma-Aldrich”). Для каждого вида наночастиц ОГ делали три повторности культуры. Клетки с наночастицами культивировали в 24-луночном планшете (“Orange Scientific”, Бельгия, площадь лунки 1.86 см<sup>2</sup>), в течение 24 ч при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Контролем служила культура клеток без наночастиц ОГ [10]. Прирост клеточной массы изучали с использованием возможностей интегрированной платформы для непрерывной фазово-контрастной визуализации живых клеток в реальном времени Cell-IQ® v2 MLF (“CM Technologies”, Финляндия).

Для визуализации морфологических изменений и функциональной активности иммунокомпетентных клеток в каждой лунке выбирали три области съемки для фазово-контрастной микроскопии. В результате проведенного исследования было получено по 222 снимка для каждой лунки экспериментального планшета и по 74 снимка для каждой области визуализации. Для анализа прироста клеточной массы, по окончании съемки на основе полученных снимков формировались библиотеки изображений, на основе которых создавались протоколы, позволяющие с использованием специализированного программного обеспечения Cell-IQ Imagen™ (“CM Technologies”, Финляндия) проводить автоматизированный подсчет прироста клеточной массы в экспериментальных условиях. На основе полученных данных строились кривые, отражающие прирост клеточной массы.

По истечении 24 ч проводили окрашивание клеток йодидом пропидия (PI, “Thermo Fisher Scientific”, США) с последующим анализом на

**Таблица 1.** Характеристика используемых в работе наночастиц ОГ-ПЭГ

	ОГ-ПЭГ- S	ОГ-ПЭГ8-S	ОГ-ПЭГ-L	ОГ-ПЭГ8 -L
Средний эффективный диаметр, нм	184 ± 73	287 ± 52	569 ± 14	1376 ± 48
Индекс полидисперсности	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.30 ± 0.01
Дзета-потенциал, мВ	-31.70 ± 1.70	-34.28 ± 0.41	-39.98 ± 1.17	-53.56 ± 1.23
Степень покрытия, мас. %	17.2 ± 1.4	20.5 ± 1.8	19.4 ± 2.2	20.5 ± 1.1

**Таблица 2.** Количество живых и высокогранулярных клеток в культурах Jurkat после инкубирования с наночастицами ОГ (Ме (Q1–Q3),  $n = 3$ )

Тип наночастиц	Концентрация	FL 3 (585/40 nm) PI-, %	FL 4 (655–730 nm) PI-, %	Высокогранулярные клетки в гейте живых Jurkat, %
Контроль	0	90.22 (87.89–91.28)	91.07 (86.12–92.31)	4.99 (4.79–5.12)
ОГ-ПЭГ- S	5 мкг/мл	88.59 (86.78–88.90)	89.43 (84.52–89.56)	4.95 (4.84–5.19)
	25 мкг/мл	84.09 (83.78–85.28)	81.96 (81.19–84.26)	5.62 (5.34–5.68)
ОГ-ПЭГ8-S	5 мкг/мл	87.40 (86.47–87.81)	86.16 (85.65–87.47)	6.64 (6.48–6.92)
	25 мкг/мл	86.63 (85.51–86.86)	86.72 (83.88–87.45)	6.50 (6.43–6.64)
ОГ-ПЭГ-L	5 мкг/мл	86.84 (83.29–88.36)	85.42 (79.75–88.00)	5.92 (5.83–6.24)
	25 мкг/мл	85.92 (85.59–88.29)	86.52 (84.16–88.80)	6.79 (6.75–7.03)
ОГ-ПЭГ8 -L	5 мкг/мл	87.05 (87.01–88.55)	86.96 (85.68–89.19)	6.82 (6.75–7.34)
	25 мкг/мл	87.27 (86.32–88.37)	86.08 (84.35–88.79)	8.29 (7.95–8.47)

проточном цитофлуориметре MACS Quant Analyzer 10 (“Miltenyi Biotec”, Германия). Учитывая, что оксид графена обладает собственной автофлуоресценцией [11], для более четкой картины жизнеспособность оценивали на 2 каналах FL3 (585/40 нм) и FL4 (655–730 нм). Дополнительно оценивали количество клеток, интернализовавших или связавших наночастицы ОГ, по количеству высокогранулярных клеток в гейте живых Jurkat по показателю бокового светорассеяния (SSC). Обработка данных осуществлялась с использованием программы KALUZA Analysis Software (“Beckman Coulter”, США), результаты выражали в виде процента живых клеток в гейте целевой популяции и в виде процента высокогранулярных клеток (табл. 2).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью стандартных пакетов STATISTICA for Windows 10.0. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Ме), 25%-ный (Q1) и 75%-ный (Q3) квартили, достоверность различий оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

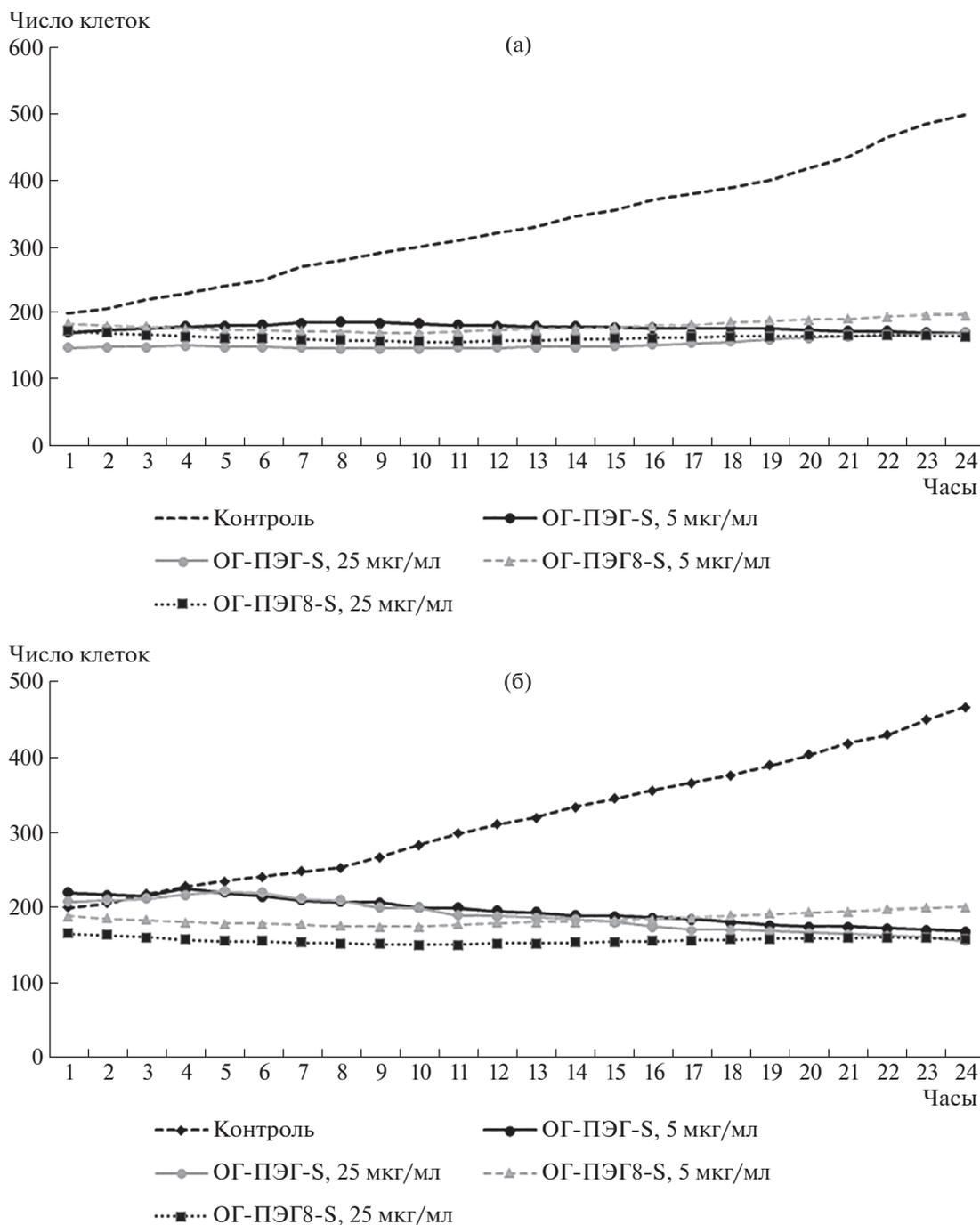
Проведенные исследования полученных нами пегелированных образцов наночастиц ОГ показали, что процесс химической модификации про-

шел успешно вне зависимости от размеров графеновых частиц, ароматическая структура ОГ не изменилась, а средний размер наночастиц пегелированного ОГ по сравнению с исходным, заявленным производителем, снижается (табл. 1).

Клеточная линия Jurkat представляет собой иммортализованную клеточную линию Т-лимфоцитов, которые быстро пролиферируют и обладают характеристиками, сходными с Т-лимфоцитами человека. Т-клетки Jurkat используют для изучения иммунных и цитотоксических реакций на противоопухолевые препараты, токсиканты и биоматериалы [12].

В нашем исследовании изучалась динамика изменения клеточной массы Т-клеток Jurkat в условиях соинкубирования с наночастицами ОГ. Данные представлены в виде кривых динамики клеточной массы, где каждая кривая – это усредненное значение числа клеток по трем точкам визуализации. Показано, что в контрольных лунках наблюдалось почти двухкратное повышение числа клеток Jurkat в точках визуализации по прошествии 24 ч культивирования (рис. 1а).

Стоит отметить линейность прироста клеток Jurkat начиная с первого часа культивирования и высокий уровень сходимости результатов между лунками. При анализе фотокадров мы также видим существенное увеличение числа клеток в точке визуализации за 24 ч инкубации (рис. 2).

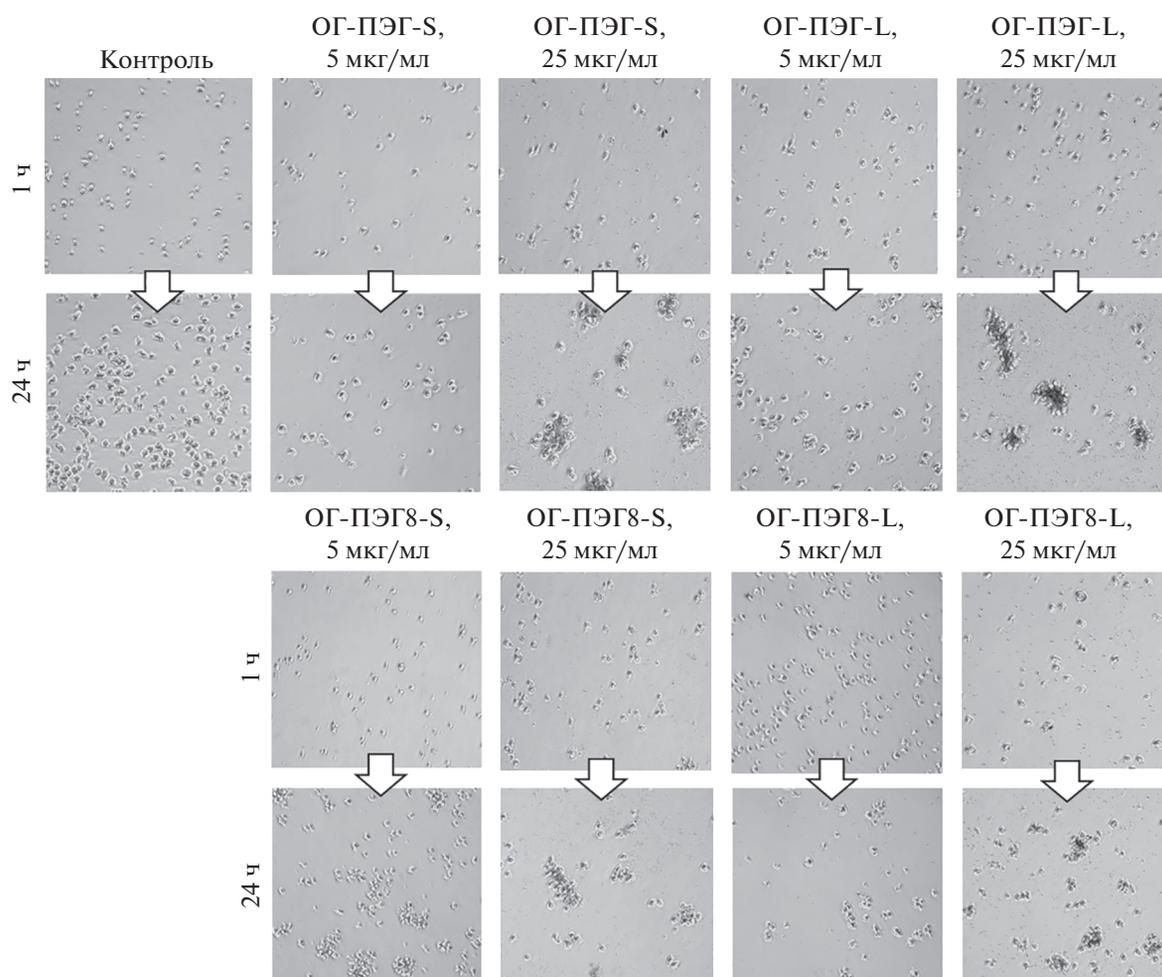


**Рис. 1.** Усредненные кривые динамики клеточной массы Jurkat при культивировании для трех повторностей в условиях взаимодействия с наночастицами ОГ ( $n = 3$ , по три точки визуализации). (а) Показано взаимодействие клеток Jurkat с наночастицами ОГ-ПЭГ-S; (б) Показано взаимодействие клеток Jurkat с наночастицами ОГ-ПЭГ-L.

По сравнению с контрольной группой наночастицы ОГ-ПЭГ-S (5, 25 мкг/мл) не показывали прироста количества клеток в точках визуализации при обоих концентрациях исследуемого образца (рис. 1а). При анализе фотокадров мы видим, что наночастицы ОГ-ПЭГ-S в высокой концентрации (25 мкг/мл) вызвали формирование

клеточных агрегатов, которое не сопровождалось, тем не менее, снижением жизнеспособности клеток в сравнении с пробой, содержащей ОГ-ПЭГ-S в низкой концентрации (5 мкг/мл) (рис. 2).

При культивировании клеток линии Jurkat с ОГ-ПЭГ8-S (5, 25 мкг/мл) количество клеток в



**Рис. 2.** Фотографии, демонстрирующие события в одной точке визуализации при взаимодействии клеток линии Jurkat с наночастицами ОГ-ПЭГ в динамике наблюдения (1 ч, 24 ч).

точках визуализации практически не изменялось, уровень сходимости результатов в зависимости от повторности был высоким (рис. 1а). Таким образом, наночастицы малой размерности (ОГ-ПЭГ-S  $184 \pm 73$  нм; ОГ-ПЭГ8-S  $287 \pm 52$  нм) существенно (более чем в 2 раза) подавляли рост клеток в культурах по сравнению с контрольной группой, при этом тип пришитого к наночастицам ПЭГ не имел значения для реализации этих эффектов.

При культивировании клеток линии Jurkat с наночастицами большей размерности (ОГ-ПЭГ-L  $569 \pm 14$  нм; ОГ-ПЭГ8-L  $1376 \pm 48$  нм) было показано, что под воздействием ОГ-ПЭГ-L (5, 25 мкг/мл) отмечено плавное снижение количества клеток в точках визуализации с высоким уровнем сходимости результатов в зависимости от повторности. Довольно интересно, что в первые 4 ч фиксировался незначительный прирост клеток, который затем переходил в постепенное снижение числа клеток. Наночастицы, покрытые разветвленным ПЭГ (ОГ-ПЭГ8-L), также подав-

ляли рост клеток Jurkat на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1б). Аналогично с образцами ОГ малой размерности, наночастицы большой размерности подавляли количество клеток в точках визуализации при обеих концентрациях исследуемого образца. При анализе фотокадров мы видим, что наночастицы ОГ-ПЭГ-L в концентрации 25 мкг/мл вызывали формирование клеточных агрегатов, как и в случае с частицами ОГ-ПЭГ-S (рис. 2). Очевидно, что именно концентрация, а не тип наночастиц вызывает формирование клеточных агрегатов.

Таким образом, установлено, что наночастицы ОГ способны подавлять пролиферацию клеток линии Jurkat, при этом размер, концентрация и тип пегилирования не имели принципиального значения. Проведенный статистический анализ показал, что различия начинали фиксироваться после 4 ч в зависимости от типа частиц, однако по истечении 24 сут все эффекты были достоверны.

При оценке жизнеспособности клеток Jurkat после суточного сокультивирования с наночастицами ОГ было показано, что число живых клеток снижалось на 5–9%, независимо от типа используемых частиц (табл. 2). Невзирая на то что статистический анализ не выявил достоверных отличий, что связано с малым числом повторов, мы не можем игнорировать видимое снижение жизнеспособности клеток в нашей экспериментальной системе. В то же время проанализировав количество высокогранулярных клеток в культуре (табл. 2), мы увидели, что в присутствии наночастиц ОГ количество этих клеток увеличивается в среднем на 2–4%, что свидетельствует о том, что некоторые клетки линии Jurkat связывают и/или интернализируют наночастицы ОГ.

В целом получены сопоставимые результаты по приросту клеточной массы и количеству живых клеток в культуре клеток Jurkat при взаимодействии с наночастицами ОГ. Полученные данные свидетельствуют о том, что наши наночастицы ОГ оказывают цитотоксический эффект на клетки линии Jurkat, снижая уровень живых клеток на 5–6%, одновременно подавляя пролиферацию этих клеток. В частности, наночастицы ОГ более чем в два раза снижали прирост клеточной массы, фиксируемый в системе прижизненной визуализации CELL-IQ, при этом сохраняя стабильное число клеток в течение всего периода наблюдения (24 ч). Мы предполагали, что высокая концентрация наночастиц (25 мкг/мл) должна была оказывать более выраженный эффект, однако наша гипотеза не подтвердилась.

Известно, что наночастицы ОГ способны дозависимо подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов, при этом надо учесть тот факт, что исследователи применяли не модифицированные наночастицы ОГ размером ~1 мкм, в концентрации 1; 12; 25 мкг/мл [13]. Относительно недавно появились сведения о влиянии ОГ и аминированного ОГ (ОГ-NH<sub>2</sub>), полученные при помощи одновременного анализа транскриптома клетки с “single-cell” масс-цитометрией. Было продемонстрировано, что ОГ снижал жизнеспособность активированных Т-хелперов в большей степени, чем ОГ-NH<sub>2</sub> [14].

Невзирая на то что в литературе отсутствуют сведения о непосредственном поглощении наночастиц ОГ клетками линии Jurkat, известно, что они способны пассивно интернализировать золотые наночастицы (25 и 50 нм) [15]. Мы продемонстрировали, что лишь малая часть клеток связывает или интернализует ОГ. Таким образом, цитотоксический эффект на клетки линии Jurkat обусловлен не поглощением, а присутствием частиц ОГ в культуральной среде.

Известно, что само присутствие частиц на основе графена способно подавлять пролиферацию

клеток и вызывать их гибель [16]. Механизмы цитотоксического действия наночастиц ОГ описаны на разных типах клеток и включают в себя окислительный стресс, митохондриально-опосредованный апоптоз, аутофагию, лизис клеток и фрустрированный фагоцитоз [17]. Используемая в работе методология не позволяет достоверно оценить конкретный механизм цитотоксичности наночастиц ОГ, однако это станет целью нашей дальнейшей работы.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ 19-15-00244.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dasari Shareena T.P., McShan D., Dasmahapatra A.K., Tchounwou P.B.* A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health // *Nanomicro Lett.* 2018. V. 10. № 3. ID 53.
2. *Raslan A., Saenz Del Burgo L., Ciriza J., Pedraz J.L.* Graphene oxide and reduced graphene oxide-based scaffolds in regenerative medicine // *Int. J. Pharm.* 2020. V. 580. P. 119226.
3. *Park M.V.D.Z., Bleeker E.A.J., Brand W., Cassee F.R., van Elk M., Gosens I., de Jong W.H., Meesters J.A.J., Peijnenburg W.J., Quik J.T.K., Vandebriel R.J., Sips A.J.A.M.* Considerations for safe innovation: the case of graphene // *ACS Nano.* 2017. V. 11. P. 9574–93.
4. *Makharza S., Cirillo G., Bachmatiuk A., Imad I., Ioannides N., Trzebicka B., Hampel S., Rummeli M.H.* Graphene oxide-based drug delivery vehicles: functionalization, characterization, and cytotoxicity evaluation // *J. Nanoparticle Research.* 2013. V. 15. P. 2099.
5. *Ou L., Lin S., Song B., Liu J., Lai R., Shao L.* The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 6633–46.
6. *de Melo-Diogo D., Lima-Sousa R., Alves C.G., Costa E.C., Louro R.O., Correia I.J.* Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2018. V. 171. P. 260–275.
7. *Dudek I., Skoda M., Jarosz A., Szukiewicz D.* The molecular influence of graphene and graphene oxide on the immune system under *in vitro* and *in vivo* conditions // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 2016. V. 64. № 3. P. 195–215.
8. *Feito M.J., Vila M., Matesanz M.C., Linares J., Gonçalves G., Marques P.A., Vallet-Regí M., Rojo J.M., Portolés M.T.* In vitro evaluation of graphene oxide nanosheets on immune function // *J. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 432. P. 221–228.
9. *Hermanson G.T.* Bioconjugate Techniques. San Diego. 2008.
10. *Литвинова Л.С., Шуплецова В.В., Дунец Н.А., Хазихматова О.Г., Юрова К.А., Хлусова М.Ю., Слепченко Г.Б., Черемней Е.Г., Шаркеев Ю.П., Комаро-*

- ва Е.Г., Седельникова М.Б., Хлусов И.А. Дисбаланс морфофункциональных реакций Т-лимфобластов линии JURKAT при краткосрочном культивировании с рельефным цинк- или медьсодержащим кальцийфосфатным покрытием на титане // Доклады Академии наук. 2017. Т. 472. № 3. С. 354–358.
11. Sunil K. Singh, Manoj K. Singh, Manasa K. Nayak, Sharda Kumari, Jose J.A. Gra'cio, Debabrata Dash. Characterization of graphene oxide by flow cytometry and assessment of its cellular toxicity // Carbon. 2011. V. 49. P. 684–692.
  12. Jurkat Cell Line – an overview | ScienceDirect Topics [Electronic resource]. URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/jurkat-cell-line> (accessed: 07.10.2019).
  13. Paino I.M., Santos F., Zucolotto V. Biocompatibility and toxicology effects of graphene oxide in cancer, normal, and primary immune cells // J. Biomedical Materials Research – Part A 2017. V.105 (3). P. 728–36.
  14. Orecchioni M., Bedognetti D., Newman L., Fuoco C., Spada F., Hendrickx W., Marincola F.M., Sgarrella F., Rodrigues A.F., Ménard-Moyon C., Cesareni G., Kostarellos K., Bianco A., Delogu L.G. Single-cell mass cytometry and transcriptome profiling reveal the impact of graphene on human immune cells // Nat. Commun. 2017. V. 8 (1). P. 1109.
  15. Mendes R.G., Koch B., Bachmatiuk A., Ma X., Sanchez S., Damm C., Schmidt O.G., Gemming T., Eckertaj J., Rummeli M.H. A size dependent evaluation of the cytotoxicity and uptake of nanographene oxide // Journal of Materials Chemistry B. 2015. V. 3. P. 2522–2529.
  16. Ou L., Lin S., Song B., Liu J., Lai R., Shao L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis // International J. Nano-medicine. 2017. V. 12. P. 6633–6646.
  17. Achawi S., Pourchez J., Feneon B., Forest V. Graphene-based materials in vitro toxicity and their structure-activity relationships: a systematic literature Review // Chem. Res. Toxicol. 2021.

## GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES INTERACTION WITH JURKAT CELL LINE IN CELL-IQ SYSTEM

**S. A. Zamorina<sup>a, #</sup>, P. V. Khramtsov<sup>a</sup>, M. B. Rayev<sup>a</sup>, V. P. Timganova<sup>a</sup>, M. S. Bochkova<sup>a</sup>, A. I. Nechaev<sup>b</sup>,  
E. O. Shunkin<sup>c</sup>, O. G. Khaziakhmatova<sup>c</sup>, V. V. Malashchenko<sup>c</sup>, and L. S. Litvinova<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Technical Chemistry of the UB RAS -branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

<sup>c</sup> I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: zamorina.sa@gmail.com

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev

In recent years, materials based on graphene oxide (GO) have been actively studied for their use in biomedicine. The aim of our study was to investigate the increase in cell mass and viability of Jurkat tumor line T cells during 24 hours of contact with GO nanoparticles in the Cell-IQ system of intravital observation. We used nanoparticles of different sizes coated with linear or branched polyethylene glycol (PEG) at concentrations of 5 and 25 µg/mL. It was shown for the first time that direct contact with GO nanoparticles decreased the increase in cell mass at the visualization points by more than twofold, regardless of nanoparticle size and concentration. Moreover, the number of live cells in the culture decreased by 5–9% after 24 hours of monitoring. Thus, PEG-coated GO nanoparticles were found to suppress the proliferation and viability of Jurkat cell line T lymphocytes.

**Keywords:** graphene oxide nanoparticles, polyethylene glycol, viability, cell mass, Jurkat, CELL-IQ

УДК 579.887.121

## АДАПТАЦИЯ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ПАТОГЕННОСТЬ МИКОПЛАЗМ: РАЗВИТИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ И ЭВОЛЮЦИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ У *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII*

© 2021 г. Е. С. Медведева<sup>1</sup>, А. А. Музыкантов<sup>1,\*</sup>, В. В. Костенко<sup>1,2</sup>,  
Н. Б. Баранова<sup>1</sup>, М. И. Маркелова<sup>1,2</sup>, Р. Г. Сабунни<sup>1,2</sup>, Д. Р. Хуснутдинова<sup>1,2</sup>,  
О. А. Чернова<sup>1</sup>, В. М. Чернов<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН А.Н. Гречкиным  
Поступило 10.08.2021 г.  
После доработки 02.09.2021 г.  
Принято к публикации 03.09.2021 г.

Впервые показано, что развитие устойчивости к ципрофлоксацину *in vitro* у *A. laidlawii* – широко распространенной микоплазмы, являющейся основным контаминантом клеточных культур и вакцин, ассоциирует с различными траекториями эволюции вирулентности: вирулом, а также вирулентность существенно различаются у ципрофлоксацин-устойчивых штаммов, в том числе штаммов с одинаковым уровнем резистентности к антимикробному препарату.

**Ключевые слова:** *Acholeplasma laidlawii*, ципрофлоксацин-устойчивые штаммы, фенотипическая резистентность, везикулярный протеом, геномный профиль, вирулом, вирулентность, *Drosophila melanogaster*

**DOI:** 10.31857/S2686738921060111

Эволюция вирулентности у микроорганизмов в условиях селективного давления биотических и абиотических стрессоров, в том числе антимикробных препаратов – серьезная проблема, на решение которой направлены усилия исследователей и фундаментальных и прикладных наук [1]. С выяснением молекулярной машинерии модуляции вирулентности микроорганизмов и определением сигнатур высоковирулентных штаммов связывают перспективы создания эффективной системы контроля эмерджентных инфекций [2]. Особый аспект этой проблемы – возможность стремительного изменения вирулентности у та-

хителичных (гипермутабельных) бактерий. К таким бактериям относятся микоплазмы (здесь и далее – собирательное название представителей класса Mollicutes) – мельчайшие из способных к самостоятельному существованию прокариоты. Они широко распространены как комменсалы высших эукариот; некоторые являются патогенами человека и животных, основными контаминантами клеточных культур и вакцинных препаратов. Инцидент внезапного расширения спектра инфицируемых видов, произошедшего у *Mycoplasma gallisepticum* – патогена домашней птицы, вследствие которого погибли миллионы диких птиц [3], существенно интенсифицировал исследование адаптации микоплазм к стрессорам, в результате которых был получен массив данных, свидетельствующих, что мельчайшие прокариоты далеко не так примитивны, как считалось ранее. При этом было установлено, что: 1) значительный вклад в адаптацию микоплазм к стрессорам и реализацию вирулентности вносят внеклеточные везикулы микоплазм; 2) антибиотикорезистентность не всегда ассоциирована с

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук”, Казань, Россия

<sup>2</sup> ФГАУ ВПО “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, Казань, Россия

\*e-mail: muzaleksei@mail.ru

мутациями в генах мишеней антимикробных препаратов, но сопровождается множественными изменениями в первичной структуре и экспрессии сотен генов, участвующих в фундаментальных клеточных процессах и реализации вирулентности; 3) селективное давление антимикробных препаратов может индуцировать крупномасштабные перестройки геномов в популяции микоплазмы по неканоническим механизмам, определяющим возможность появления множества линий с различными вариантами фенотипов и вирулентности [4, 5]. Полученные данные свидетельствуют о значительном арсенале средств адаптации у мельчайших прокариот, их высокой пластичности, и позволяют предполагать, что адаптация микоплазмы даже к одному антибиотику может ассоциировать с разнообразными траекториями эволюции вирулентности. Однако публикации в отношении проверки соответствующей гипотезы пока отсутствуют. Сравнительный анализ профилей геномов и везикулярных протеомов, а также вирулентности штаммов *Acholeplasma laidlawii* (убиквитарная микоплазма, инфицирующая человека, животных, растения, являющаяся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов), проявляющих высокий уровень устойчивости к цiproфлоксацину, явился задачей нашего исследования, в результате выполнения которого впервые показано, что развитие устойчивости к цiproфлоксацину *in vitro* у *A. laidlawii* ассоциирует с различными траекториями эволюции вирулентности: вирулом, а также вирулентность существенно различаются у цiproфлоксацин-устойчивых штаммов, в том числе штаммов с одинаковым уровнем резистентности к антимикробному препарату.

В работе использовали штамм *Acholeplasma laidlawii* PG8B из коллекции микроорганизмов ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России (Москва). Резистентный к цiproфлоксацину штамм *A. laidlawii* PG8R10 (МПК 20 мкг/мл) был получен нами из клона штамма PG8B (МПК 0.5 мкг/мл), а резистентные к цiproфлоксацину штаммы PG8r3 и PG8r1 с одинаковым показателем МПК (10 мкг/мл) – в результате пошаговой селекции изолятов одного клона PG8B при совместном культивировании с везикулами PG8R10 и без добавления везикул микоплазмы соответственно [6]. Культивирование микоплазмы, выделение, очистку внеклеточных везикул штаммов и контроль чистоты препаратов (отсутствие клеток микоплазмы в образцах везикул) осуществляли, как описано [7].

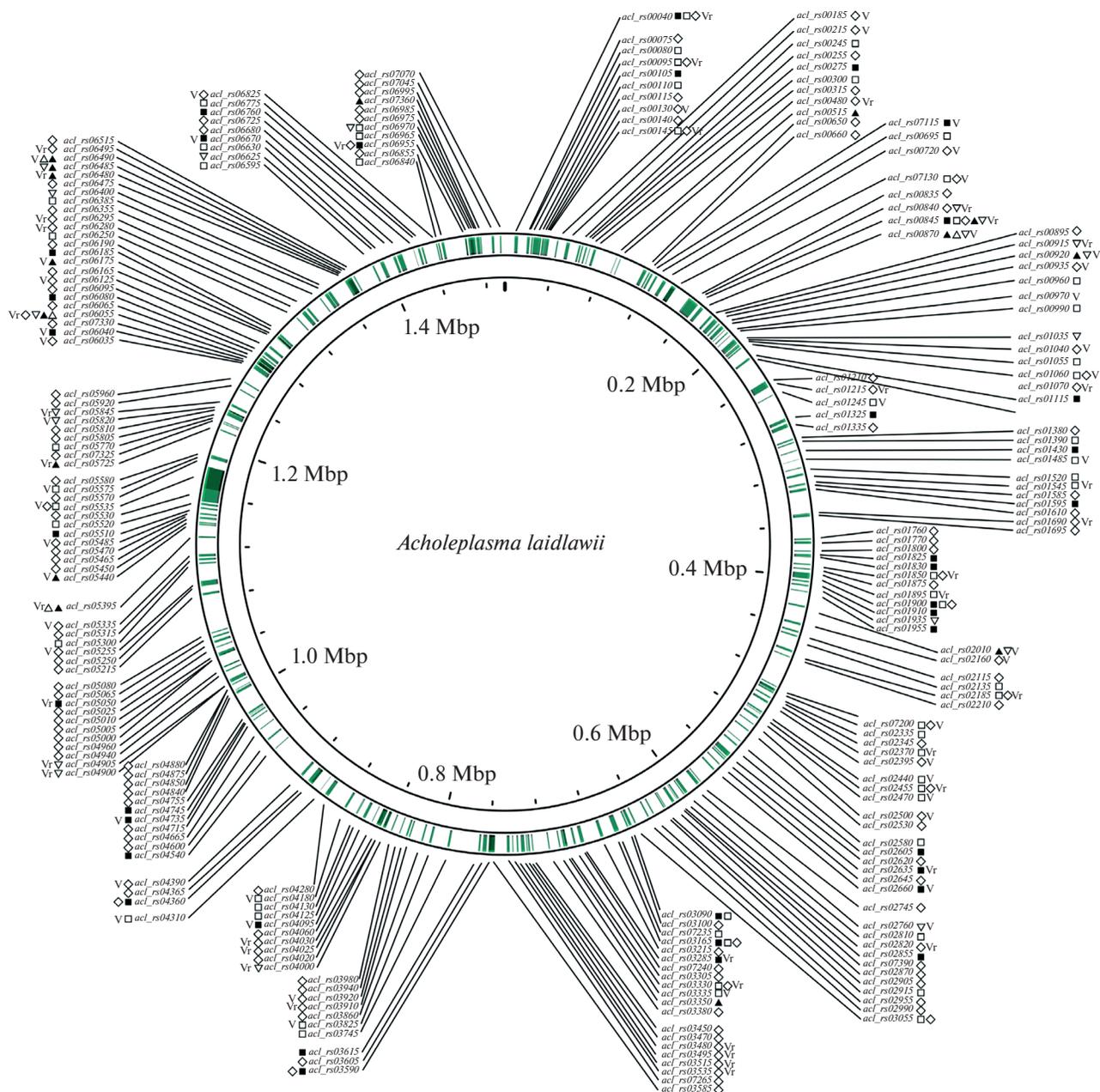
Секвенирование геномов штаммов *A. laidlawii* проводили на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали программу Sequencing Analysis 5.3.1 (“Applied Biosystems”, США), а также базу данных NCBI (National Center for Biotech-

nology Information); для выравнивания нуклеотидных последовательностей – Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), для поиска и аннотации однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) – Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) и SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff.html>) соответственно.

Протеомное профилирование внеклеточных везикул *A. laidlawii* проводили с помощью хромато-масс-спектрометрии, как описано [7]. Для поиска белков, ассоциированных с бактериальной вирулентностью, использовали базу данных VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>). Анализ вирулентности штаммов микоплазмы проводили на модельном организме *Drosophila melanogaster* (линия *Canton-S*). Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде; для инфицирования клетками штаммов *A. laidlawii* получали синхронные кладки эмбрионов, которые переносили на питательную среду с добавлением  $10^6$ – $10^7$  клеток бактерии. Клетки штаммов *A. laidlawii* предварительно отмывали от культуральной среды и суспендировали в фосфатно-солевом буфере. В качестве контроля использовали мух, выращенных на среде, не содержащей *A. laidlawii*. Контроль инфицирования дрозофил микоплазмой осуществляли с помощью ПЦР со специфичными праймерами [6]. Для оценки вирулентности штаммов *A. laidlawii* использовали стандартные показатели репродукции и жизнеспособности особей (количество отложенных яиц и выживших эмбрионов [8, 9]). Для оценки поврежденности ДНК в энтероцитах мух применяли вариант метода “ДНК-комет” (“DNA-comet assay”), позволяющий определять односторонние разрывы ДНК в клетках [10]. Для визуализации и ранжировки “ДНК-комет” использовали флуоресцентный микроскоп (Carl Zeiss Axio Imager M2, Германия).

Метагеномное профилирование микробного сообщества кишечника инфицированных и не инфицированных микоплазмой дрозофил проводили с помощью секвенирования 16S рРНК, как описано [11]. Для оценки таксономического разнообразия микробиоты кишечника мух использовали индекс Шеннона. Метагеномные данные анализировали с помощью программного пакета QIIME v1.9.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 12.0. Эксперименты проводили в трех повторностях. Для каждого показателя вычисляли среднее арифметическое, его ошибку и стандартное отклонение. Статистически значимые различия между исследуемыми группами оценивали с использованием post-hoc теста с применением критерия Фишера. В тесте ДНК-комет статистически значимые различия определяли с помощью t-критерия Стьюдента ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 1.** Локализация генов, ассоциированных с развитием резистентности *Acholeplasma laidlawii* к ципрофлоксацину, на геномной карте референсного штамма *A. laidlawii* PG-8A. Данные представлены для штаммов *A. laidlawii* PG8r1 (■, ▲), *A. laidlawii* PG8r3 (□, △) и *A. laidlawii* PG8r10 (◇, ▽). ■, □, ◇ – гены, в первичной структуре которых обнаружены мутации у штаммов (относительно *A. laidlawii* PG8B); ▲, △, ▽ – гены, кодирующие белки, выявленные во внеклеточных везикулах штаммов; ▽ – гены, кодирующие факторы бактериальной вирулентности; Vr – гены, кодирующие белки, регулирующие бактериальную вирулентность. Графическое изображение хромосомы получено с помощью программы Proksee (<https://beta.proksee.ca/>).

В результате анализа данных полногеномного секвенирования штаммов *A. laidlawii* с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину нами было установлено, что развитие резистентности к антимикробному препарату во всех случаях сопровождается множественными изменениями в первичной структуре генома микро-

плазмы. Мутации регистрируются в генах, вовлеченных не только в адаптацию к фторхинолонам, но также фундаментальные клеточные процессы. При этом адаптация *A. laidlawii* к ципрофлоксацину сопровождается изменениями в вируломе – мутации обнаруживаются в генах факторов/регуляторов бактериальной вирулентности, но про-

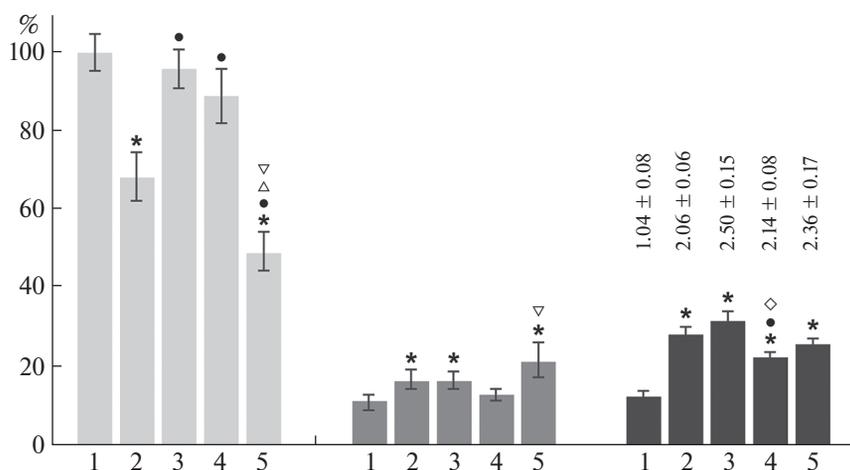


Рис. 2. Вирулентность штаммов *A. laidlawii* в отношении *D. melanogaster*.

1 – мухи, не инфицированные *A. laidlawii*; 2–5 – мухи, инфицированные штаммами *A. laidlawii* PG8B, PG8R10, PG8r1, PG8r3 соответственно. Данные представлены в виде среднего арифметического значения  $\pm$  стандартное отклонение.

■, ■, ■ – количество отложенных яиц, погибших особей, энтероцитов с одностранными разрывами ДНК (цифры указывают индекс повреждения ДНК) соответственно. \* – достоверные ( $p < 0.05$ ) отличия по сравнению с неинфицированными мухами; • – достоверные ( $p < 0.05$ ) отличия по сравнению с мухами, инфицированными *A. laidlawii* PG8B; ◇, Δ, ∇ – достоверные ( $p < 0.05$ ) отличия между мухами, инфицированными штаммами *A. laidlawii* PG8R10 и PG8r1, PG8R10 и PG8r3, PG8r1 и PG8r3 соответственно.

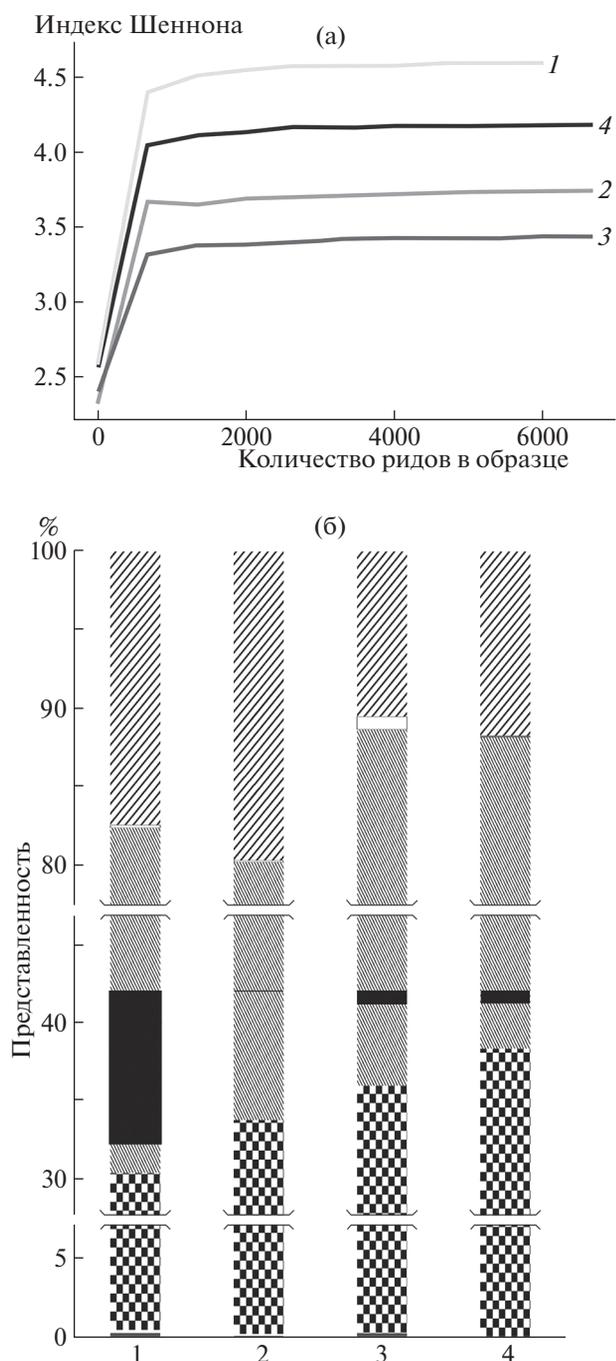
филь мутантных генов у штаммов существенно различается (рис. 1).

Обнаружены только четыре гена, мутации в которых есть у всех резистентных штаммов микоплазмы – *acl\_rs00040*, *acl\_rs00845*, *acl\_rs01900* и *acl\_rs03165*, кодирующих: 1) ДНК-гиразу (субъединица А); 2) ДНК-зависимую РНК-полимеразу (субъединица бета'); 3) ДНК топоизомеразу IV (субъединица А) и 4) белок семейства MscC соответственно. Однако профиль мутаций этих генов у штаммов не совпадает. Таким образом, генетическая сигнатура вирулома, характерная для всех исследованных цiproфлоксацин-устойчивых штаммов *A. laidlawii*, отсутствует.

Развитие антибиотикоустойчивости у *A. laidlawii* связано с изменением секреции сотен белков, ассоциированной с везикулами микоплазмы, опосредующими межклеточные взаимодействия и патогенез. При этом профили везикулярных белков разных штаммов, резистентных к цiproфлоксацину, существенно различаются. Эти различия касаются и факторов/регуляторов вирулентности (рис. 1). Единственный общий фактор вирулентности в везикулах штаммов – бифункциональная ацетальдегид-СоА/алкогольдегидрогеназа, но специфичным маркером вирулентности цiproфлоксацин-устойчивых штаммов микоплазмы этот белок не является, поскольку присутствует также в везикулах цiproфлоксацин-чувствительного штамма *A. laidlawii* PG8B [7], что может определять его перспективы как мишени-кандидата для контроля микоплазмы.

Различия профилей геномов и везикулярных протеомов у *A. laidlawii* PG8R10, PG8r1 и PG8r3, ассоциированные с факторами/регуляторами вирулентности, позволяют предполагать дифференциальный потенциал вирулентности у соответствующих штаммов микоплазмы. Для проверки этого предположения нами выполнен анализ вирулентности штаммов *A. laidlawii* *in vivo* на модельном организме *D. melanogaster*, по отношению к которому микоплазмы могут быть комменсалами и патогенами [12]. Согласно полученным данным, инфицирование *D. melanogaster* клетками штаммов *A. laidlawii* может оказывать негативное влияние на жизнеспособность и репродукцию дрозофилы, структуру ДНК энтероцитов (рис. 2) и состав микробиоты кишечника мух (рис. 3; нуклеотидные последовательности 16S рРНК депонированы в базу данных Sequence Read Archive, номер PRJNA751047, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA751047>), в том числе в отношении представленности рода *Lactobacillus*, изменения которой могут приводить к значимым изменениям геномного профиля в популяциях *D. melanogaster* за короткое время – в течение пяти генераций [13].

Выраженность негативного эффекта штаммов микоплазмы в отношении структуры ДНК энтероцитов и состава микробиоты кишечника *D. melanogaster* совпадает – чем ниже оказывается таксономическое разнообразие кишечной микробиоты у мух, тем выше уровень ДНК-повреждений в клетках их кишечника. Различия между цiproфлоксацин-устойчивыми штаммами в от-



**Рис. 3.** Особенности изменений таксономического разнообразия (а) и относительной представленности бактериальных отделов (б) в микробном сообществе кишечника у *D. melanogaster* при инфицировании штаммами *A. laidlawii*.

1 – мухи, не инфицированные *A. laidlawii*; 2–4 – мухи, инфицированные штаммами *A. laidlawii* PG8B, PG8R10 и PG8r3 соответственно.

/// Actinobacteria, □ Bacteroidetes, ▨ Firmicutes, ■ род *Lactobacillus*, ■ Proteobacteria, ▩ другие.

ношении повреждений ДНК энтероцитов в основном незначимы – достигают достоверности только у PG8R10 и PG8r1, штаммов с разным

уровнем резистентности. В случае других параметров достоверные различия обнаруживаются и у штаммов с одинаковым уровнем резистентности.

Таким образом, в результате наших исследований впервые показано, что развитие устойчивости к ципрофлоксацину *in vitro* у *A. laidlawii* ассоциирует с различными траекториями эволюции вирулентности микоплазмы: вирулом, а также вирулентность существенно различается у ципрофлоксацин-устойчивых штаммов, в том числе штаммов с одинаковым уровнем резистентности к антимикробному препарату. Полученные данные определяют необходимость проведения всесторонних исследований механизмов эволюции вирулентности тахителичных бактерий *in vivo* на модельных организмах при селективном давлении антимикробных препаратов для выяснения потенциала клональной диверсификации в бактериальной популяции [14] в отношении модуляции вирулентности, определения маркеров высоковирулентных штаммов и коррекции стратегии контроля микоплазм.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turner W.C., Kamath P.L., van Heerden H., et al. // R Soc Open Sci. 2021. V. 8. P. 210088.
2. Pan Y., Zeng J., Li L., et al. // mSystems. 2020. V. 5. № 3. P. e00821-19.
3. Hochachka W.M., Dhondt A.A., Dobson A., et al. // Proc Biol Sci. 2013. V. 280. P. 20131068.
4. Faucher M., Nouvel L.-X., Dordet-Frisoni E., et al. // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 1. P. e1007910.
5. Chernova O.A., Chernov V.M., Mouzykantov A.A., et al. // Int J Antimicrob Agents. 2021. V. 57. P. 106253.
6. Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., et al. // Data in Brief. 2020. V. 33:106412.
7. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // J. Proteomics. 2014. V. 110. P. 117–128.
8. Qiao H., Keesey I.W., Hansson B.S., Knaden M. // J Exp Biol. 2019 Mar 1;222(Pt 5):jeb192500.
9. Sullivan W., Ashburner M., Hawley E.S. *Drosophila* protocols. 2000. New York: Cold Spring Harbour Press. 728 p.
10. Mukhopadhyay I., Chowdhuri D.K., Bajpayee M., et al. // Mutagenesis. 2004. V.19. P. 85–90.
11. Kang D., Douglas A.E. // Biol Lett. 2020. V. 16. № 2. P. 20190803.
12. Ventura I.M., Martins A.B., Lyra M.L., et al. // Microb Ecol. 2012. V. 64. P. 794–801.
13. Rudman S.M., Greenblum S., Hughes R.C., et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2019. V. 116. P. 20025–20032.
14. Rakovskaya I.V., Ermolaeva S.A., Levina G.A., et al. // J Med Microbiol. 2019. V. 68. P. 1747–1758.

**ADAPTATION TO ANTIMICROBIALS AND PATHOGENICITY  
IN MYCOPLASMAS: DEVELOPMENT OF CIPROFLOXACIN-RESISTANCE  
AND EVOLUTION OF VIRULENCE IN *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII***

**E. S. Medvedeva<sup>a</sup>, A. A. Mouzykantov<sup>a,#</sup>, V. V. Kostenko<sup>a,b</sup>, N. B. Baranova<sup>a</sup>, M. I. Markelova<sup>a,b</sup>,  
R. G. Sabouni<sup>a,b</sup>, D. R. Khusnutdinova<sup>a,b</sup>, O. A. Chernova<sup>a</sup>, and V. M. Chernov<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Science Centre of RAS, Kazan, Russian Federation

<sup>b</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: muzaleksei@mail.ru

Presented by Academician of the RAS A.N. Grechkin

For the first time it was shown that the development of resistance to ciprofloxacin *in vitro* in *Acholeplasma laidlawii*, a widely spread in nature mycoplasma, which is the main contaminant of cell cultures and vaccines, is associated with diverse trajectories of virulence evolution: virulome as well as virulence differ significantly between ciprofloxacin-resistant strains, including ones with the same level of antimicrobial resistance.

*Keywords:* *Acholeplasma laidlawii*, ciprofloxacin-resistant strains, phenotypic resistance, vesicular proteome, genomic profile, virulome, virulence, *Drosophila melanogaster*

УДК 593.95

## ЦЕЛОМИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ПРЕДСТАВИТЕЛЯ МОРСКИХ ЕЖЕЙ *STRONGYLOCENTROTUS PALLIDUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA) И ПРОБЛЕМА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ МЕТАМЕРИИ У ИГЛОКОЖИХ

© 2021 г. О. В. Ежова<sup>1,\*</sup>, Ю. А. Кокуркина<sup>1</sup>, К. И. Белолобская<sup>1</sup>,  
академик РАН В. В. Малахов<sup>1</sup>

Поступило 01.04.2021 г.  
После доработки 04.06.2021 г.  
Принято к публикации 04.06.2021 г.

Метамерия имеется у представителей основных филогенетических ветвей Bilateria. Среди Deuterostomia метамерия характерна для полухордовых и хордовых. Показано, что у морских ежей имеется 7 метамерных целомических колец, расположенных вдоль орально-аборальной оси тела. Подобная целомическая метамерия характерна также для представителей других классов иглокожих. Предложена гипотеза, согласно которой метамерные целомические кольца иглокожих представляют собой наследие метамерии, свойственной общему предку Deuterostomia. Диссимметрия в строении целомов иглокожих является результатом лежания предковых форм на правом боку, что привело к редукции целомов правой стороны. При переходе к сидячему образу жизни левые целомы сформировали метамерные целомические кольца.

*Ключевые слова:* метамерия, целомы, диссимметрия, происхождение иглокожих

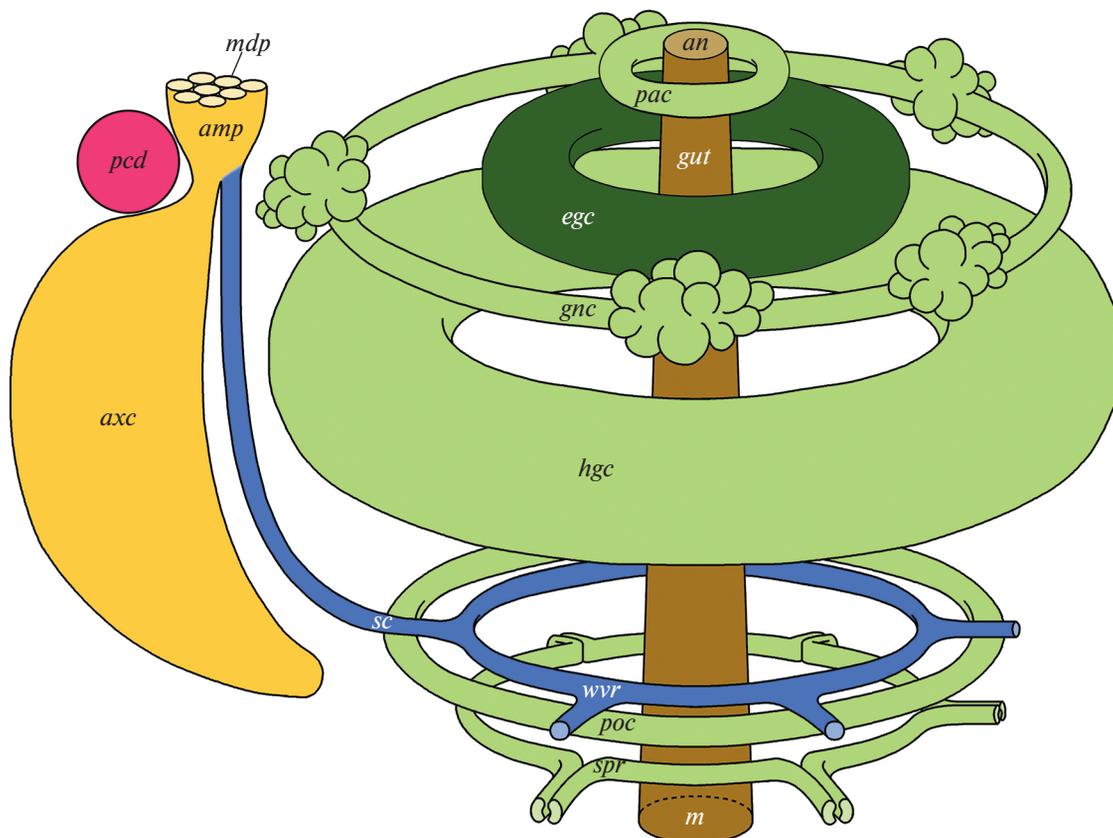
DOI: 10.31857/S2686738921050103

В современной системе животного царства выделяется четыре основных группы билатерально-симметричных животных: Trochozoa, Lophophorata, Ecdysozoa и Deuterostomia [1, 2]. Целомическая метамерия имеется у представителей всех четырех стволов Bilateria, что позволяет предполагать, что и общий предок Bilateria был сегментированным организмом [2–4]. Среди вторичноротых несомненной метамерией обладают хордовые животные (Chordata). Метамерия Hemichordata выражается в наличии метамерных жаберных щелей и жаберных пор, происхождение которых, вероятно, связано с метамерией метанефридиев и энтодермальных кишечных карманов [5]. Все это позволяет поставить вопрос о том, сохраняется ли метамерия у иглокожих (Echinodermata). У иглокожих известны метамерные структуры, однако эта метамерия затрагивает придатки тела: имеется в виду метамерное расположение склеритов в стебельке морских лилий, метамерные позвонки в руках офиур

и др. Проблема наличия у иглокожих целомической метамерии, сравнимой с метамерией хордовых, членистоногих, аннелид и других истинно метамерных животных, обсуждалось с позиции теории первичной гетерономной метамерии П.П. Иванова [6]. Согласно взглядам П.Г. Светлова и О.М. Ивановой-Казас [7, 8], три пары целомов диплеврулы рассматриваются как ларвальные сегменты, тогда как у хордовых оказываются развитыми не только ларвальные, но и постларвальные сегменты (туловищные сомиты) [9]. В настоящей работе мы попытаемся найти ответ на вопрос, сохраняются ли у иглокожих остатки соматоцельных целомических сегментов, сопоставимых с метамерными туловищными сомитами хордовых. Возможно, у иглокожих сохраняются остатки метамерии, которой обладал общий предок Deuterostomia, а может быть, и общий предок Bilateria. Мы предприняли новое исследование целомической организации типичного представителя иглокожих – морского ежа *Strongylocentrotus pallidus* (G.O. Sars, 1871) – с использованием современных методов 3D-реконструкции, чтобы получить объективное представление о взаимном расположении целомических компарментов.

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\* e-mail: olga.ejova@gmail.com



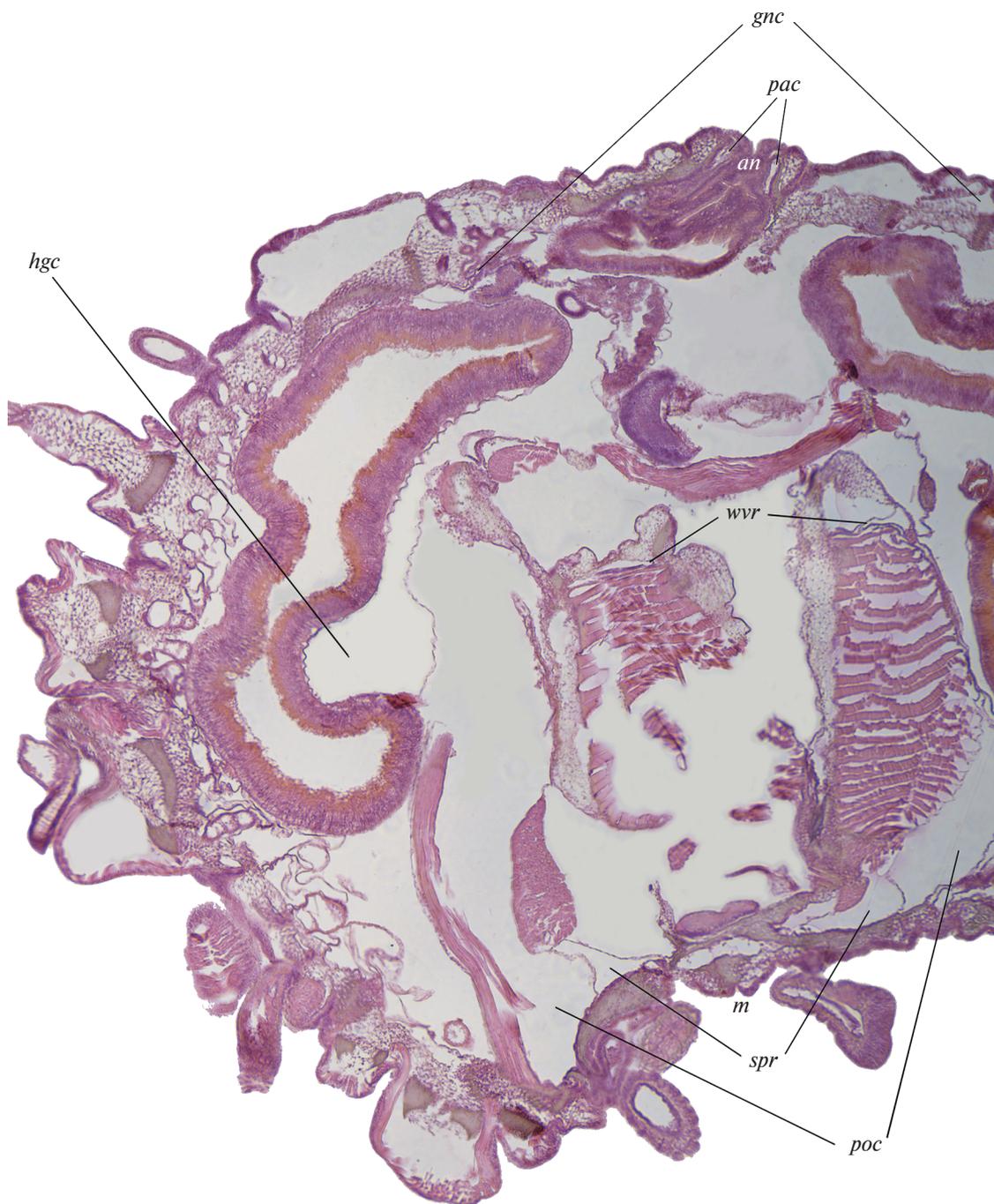
**Рис. 1.** Организация целомической системы *Strongylocentrotus pallidus*. amp – madreporная ампула; an – анальное отверстие; axc – осевой целом; egc – эпигастрический целом; gnc – генитальный целом; gut – кишечная трубка; hgc – гипогастрический целом; m – рот; mdp – madreporная пластинка; pac – перианальный целом; pcd – перикардиальный целом; poc – периоральный целом; sc – каменный канал; spr – соматоцельное перигемальное кольцо; wvr – амбулакральное кольцо.

Материалом для работы послужили 7 экземпляров *S. pallidus* (Echinoidea), собранные в районе биостанции “Дальние Зеленцы” (Баренцево море), с глубин 20–30 м. Диаметр собранных экземпляров составлял приблизительно 10 мм. Материал был зафиксирован в жидкости Буэна, а затем перенесен для консервации в 70-ный этиловый спирт. Для декальцинации применялся раствор ЭДТА (Трилон Б, Хелатон-3). Для гистологического исследования использовалась стандартная методика дегидратации материала в спиртах восходящей концентрации, пропитки парапластом и разложения на серии срезов толщиной 5 мкм с помощью микротомы “Leica RM 2125”. Срезы окрашивались гематоксилином Караччи. Изучение срезов производилось с помощью микроскопа “Микмед-6” (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия, 2018) с цифровой камерой “МС-12”. По сериям гистологических срезов была осуществлена детальная 3D-реконструкция целомической системы в программе AMIRA, версия 6.5.0. Для рекон-

струкции использовалась орально-аборальная серия, состоящая из 240 срезов.

Амбулакральное кольцо *S. pallidus* (производное левого гидроцеля) лежит в средней части тела и окружает глотку над Аристотелевым фонарем (рис. 1, 2, wvr). Оно оказывается как бы вставленным между двумя другими целомическими кольцами: перивисцеральным целомом (рис. 1, hgc), представляющим главную полость тела морского ежа, и обширным периоральным целомом (рис. 1, poc), окружающим челюстной аппарат. Между целотелиями всех трех целомических колец – амбулакralного, перивисцерального и периорального – проходит оральное кровеносное кольцо.

Каменный канал (рис. 1, sc) располагается в верхней, аборальной половине тела *S. pallidus*, и на своем оральном конце впадает в амбулакральное кольцо (рис. 1, wvr). Аборальный конец каменного канала открывается в ампулу madreporита (рис. 1, amp), которая представляет собой очень уплощенную целомическую цистерну (производное левого аксоцеля). С внешней средой madre-



**Рис. 2.** Производные левого соматоцеля *Strongylocentrotus pallidus* на сагитальном срезе в области интеррадиуса CD. *an* – анальное отверстие; *gnc* – генитальный целом; *hgc* – перивисцеральный целом, образованный в результате слияния гипогастрического и эпигастрического целомов; *m* – рот; *pac* – перианальный целом; *roc* – периоральный целом; *spr* – соматоцельное перигемальное кольцо; *wvr* – амбулакральное кольцо.

поровая ампула сообщается посредством множества (на изученных экземплярах до 200) тонких поровых каналов, которые пронизывают толщу madreporовой пластинки (рис. 1, *mdp*). Снизу, со стороны радиуса D, в madreporовую ампулу откры-

ваются каменистый канал (рис. 1, *sc*) и осевой целом (производное левого аксоцеля) (рис. 1, *axc*).

Осевой целом *S. pallidus* (рис. 1, *axc*) вытянут вдоль каменистого канала, к которому примыкает вплотную со стороны радиуса C. В аборальной

области осевой целом представляет собой обширную, хорошо заметную на гистологических срезах полость. В других участках полость осевого целома практически вытеснена разросшимся осевым органом и поэтому представлена узкими щелевидными пространствами. На аборальной стороне осевой целом сообщается с ампулой мадрепорита (рис. 1, *amp*), а на оральной стороне оканчивается слепо в области впадения каменистого канала в амбулакральное кольцо. Аксоцельного перигемального целомического кольца осевой целом *S. pallidus* не образует.

Перикардиальный целом *S. pallidus* (производное правого аксоцеля) (рис. 1, *pcd*) представляет собой дисковидный целомический компартмент, не сообщающийся ни с какими иными целомическими полостями. С аборальной стороны перикард граничит с мадрепоровой ампулой (рис. 1, *amp*). На оральной стороне, со стороны радиуса С, к перикарду примыкают осевой целом (рис. 1, *axc*) и генитальный целом (рис. 1, *gnc*), а со стороны радиуса D — перивисцеральный целом (рис. 1, *hgc*).

Генитальный целом (производное левого соматоцеля) (рис. 1, 2, *gnc*) представляет собой целомическое кольцо, примыкающее к аборальной стенке тела *S. pallidus* и окружающее заднюю кишку. Генитальное кровеносное кольцо проходит в мезентерии между генитальным целомом и перивисцеральным целомом.

В самой аборальной части тела *S. pallidus* имеется маленькое целомическое кольцо, окружающее заднюю кишку. Это перианальное кольцо (рис. 1, 2, *pac*), происходящее от левого соматоцеля. Оно примыкает к обширному перивисцеральному целому.

Перивисцеральный целом (рис. 2, *hgc*) представляет собой очередное целомическое кольцо, окружающее кишку. Он образуется в результате слияния двух целомических полостей: одного из производных левого соматоцеля (гипогастрическое целомическое кольцо) (рис. 1, *hgc*) и единственного производного правого соматоцеля (эпигастрическое целомическое кольцо) (рис. 1, *egc*).

Периоральное (или перифарингеальное) целомическое кольцо *S. pallidus* (рис. 1, 2, *por*) располагается в оральной половине тела животного и окружает глотку. Оно имеет очень сложную форму, поскольку вдаётся во внутренние желоба пирамид, в пространства между самими пирамидами, включает в себя зубы, т.е. как бы “обволакивает” многочисленные известковые элементы Аристотелева фонаря. Периоральный целом окружен перивисцеральным целомом с боков и с аборальной стороны. В циркуморальном мезентерии между перивисцеральным и периоральным целомами проходит оральное кровеносное кольцо.

Соматоцельное перигемальное целомическое кольцо *S. pallidus* (производное левого соматоцеля) (рис. 1, 2, *spr*) лежит в самой оральной части тела. Здесь оно окружает челюстной аппарат и примыкает к периоральному целому. От соматоцельного перигемального кольца в каждый радиус отходит по паре целомических выростов.

Таким образом, целома *S. pallidus*, за исключением осевого и перикардиального, образуют серию из 7 циркуминтестинальных колец, расположенных вдоль орально-аборальной оси тела. Подобное расположение целомических колец характерно и для других групп иглокожих. В частности, у разных видов морских звезд можно насчитать от 6 до 7 колец, у офиур — 7, у голотурий — 4, у морских лилий — 4 [10–12].

Наличие метамерных целомических колец у Echinodermata позволяет предполагать, что метамерия иглокожих происходит от метамерии, свойственной общим предкам вторичноротых животных (рис. 3). Метамерия Hemichordata складывается из следующих элементов: 1) предротовой сегмент, содержащий диссимметричные левый (хоботный) и правый (перикардиальный) целома, 2) окологротовой сегмент, содержащий симметричные воротниковые целома, и 3) туловищный целом, в котором диссепименты не сохраняются, но метамерия туловищного отдела очевидна в метамерии жаберных пор, жаберных щелей и дивертикулов кишечника. У хордовых животных метамерия выражается в наличии премандибулярных, мандибулярных и туловищных сомитов. Это позволяет предполагать, что общий предок Deuterostomia обладал метамерией, сходной с таковой у Annelida или зародышей Arthropoda, т.е. обладал предротовым сегментом, окологротовым сегментом и метамерным туловищем. В каждом из сегментов имелась пара целомических мешков. У Hemichordata и Cephalochordata имеет место диссимметрия в организации целома предротового отдела. Как известно, иглокожие обладают значительно более выраженной диссимметрией целома, чем все остальные вторичноротые. У иглокожих сохраняется только левый гидроцель (гомолог левого воротникового целома). Как следует из данных настоящей работы и данных других исследователей [10–12], диссимметричным оказывается и строение туловищных целома. В частности у *S. pallidus* имеется 5 целомических колец, происходящих от левого соматоцеля личинки, и только одно происходящее от правого соматоцеля. Такое же соотношение характерно и для морских звезд, офиур, голотурий и морских лилий.

Для объяснения диссимметричной организации иглокожих предлагались гипотезы, согласно которым предполагаемые предки иглокожих были обращены к субстрату правой стороной тела, в

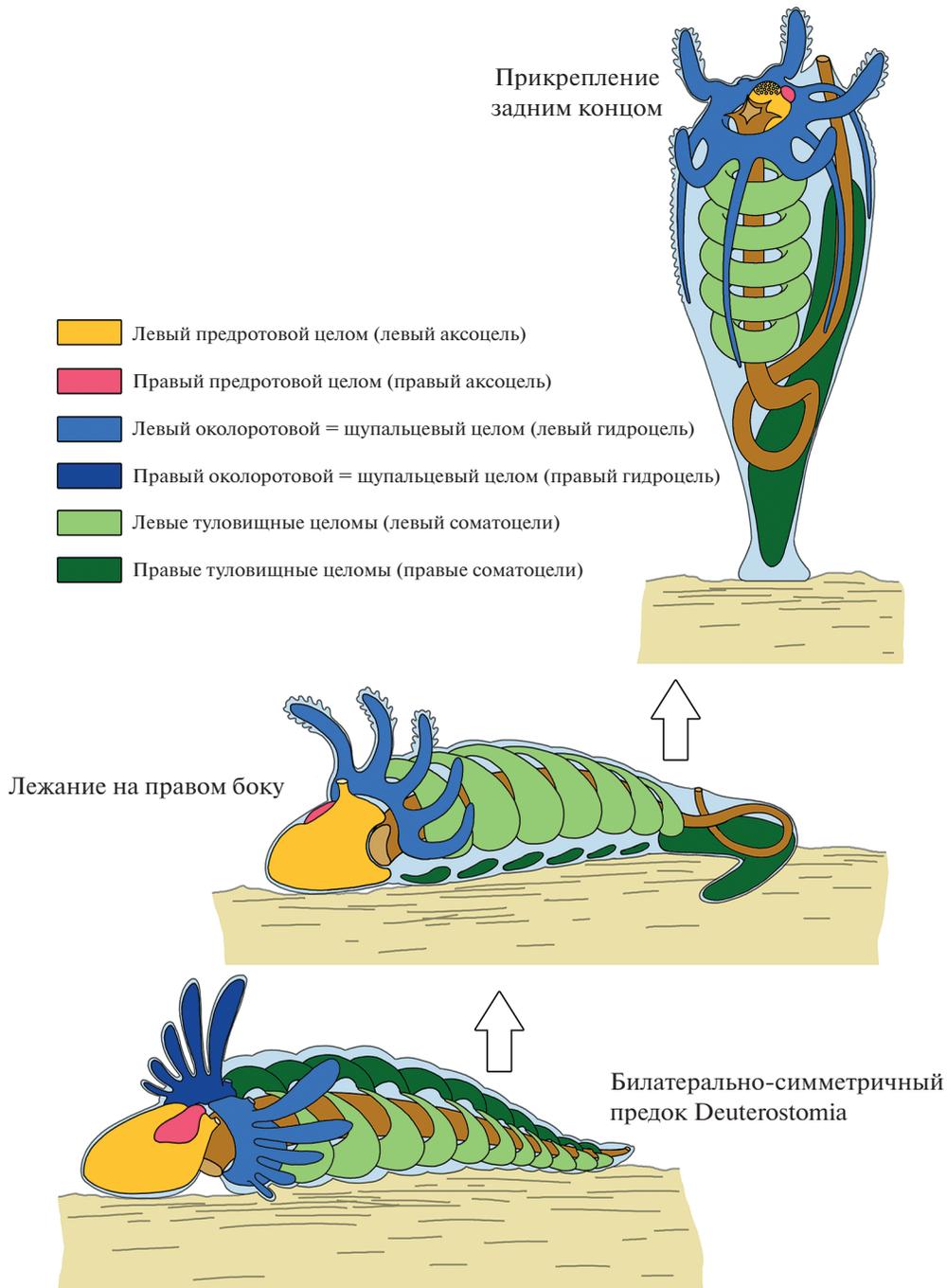


Рис. 3. Реконструкция возможного хода эволюции целомической системы Echinodermata.

результате чего и возникла диссимметрия целомов [13, 14]. При этом щупальцевый аппарат левой стороны тела и левый гидроцель сохранились, тогда как щупальцевый аппарат на правой стороне и соответствующий ему правый гидроцель подверглись полной редукции [13, 14]. Можно предполагать, что в этом случае редукции под-

верглись также и большинство метамерных соматоцельных целомов правой стороны (рис. 3).

С другой стороны, Холланд предполагает, что редукция правых переднего и среднего целомов объясняется лежанием на левом боку [15]. Впоследствии предки иглокожих перешли к прикрепленному образу жизни, в результате чего

сформировалась вторичная радиальная симметрия, а сохранившиеся левые целомы воротничкового и туловищного отделов сформировали циркуминтестинальные целомические кольца (рис. 3). Любопытно, что у Echinodermata даже расположение целомических колец соответствует тому порядку, в котором располагаются метамерные целомы у полухордовых и хордовых. Аксоцельное перигемальное кольцо (которое отсутствует у морских ежей) соответствует самому переднему хоботному целому полухордовых (премандибулярным сомитам хордовых), за ним следует амбулакральное кольцо, гомологичное левому воротничковому целому полухордовых (левому мандибулярному сомиту хордовых), далее следуют соматоцельный перигемальный целом, периоральный целом, гипогастрический целом и генитальный целом, которые соответствуют левым туловищным сомитам хордовых. Эпигастрический целом, происходящий от правого соматоцеля личинки, вероятно, соответствует стебельку предполагаемого предка, который использовался как заякоривающий орган. В рамках предлагаемой гипотезы предки иглокожих заякоривались в субстрате модифицированным задним концом тела, на основе которого сформировался стебелек сидячих представителей этого типа. На первый взгляд последнему предположению противоречит тот факт, что личинки современных морских лилий прикрепляются к субстрату предротовым участком тела. Этот факт обычно интерпретируется как свидетельство того, что стебелек морских лилий происходит от предротовой лопасти личинки. Однако если бы это было справедливо, то в стебельке морских лилий находились бы производные аксоцеля (предротового целома). Но в стебельке морских лилий находятся производные правого соматоцеля (камерный орган). По нашему мнению, в онтогенезе морских лилий нашли отражение два процесса: 1) ползание предковых форм на предротовой лопасти, подобно тому, как это сейчас имеет место у крыложаберных полухордовых (Graptolithoidea, бывшие Pterobranchia); 2) прикрепление задним концом тела, как это свойственно молодым кишечнодышащим полухордовым (Enteropneusta).

Разумеется, предложенная гипотеза нуждается в обосновании данными современной биологии развития и в подкреплении палеонтологическим материалом.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Все гистологические работы и компьютерная 3D-реконструкция осуществлены в студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных ([www.evolmorphan.ru](http://www.evolmorphan.ru)) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-74-10025.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

У авторов нет финансовых или каких-либо иных конфликтов интересов. Все авторы прочли финальную версию рукописи. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Halanych K.M.* The new view of animal phylogeny // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2004. V. 35. P. 229–256.
2. *Малахов В.В.* Новая система билатерий // *Вестник РАН.* 2010. Т. 80. № 1. С. 27–44.
3. *Balavoine G., Adoutte A.* The Segmented Urbilateria: A Testable Scenario // *Integr. Comp. Biol.* 2003. V. 43. P. 137–147.
4. *Seaver E.C.* Segmentation: mono- or polyphyletic? // *Int. J. Dev. Biol.* 2003. V. 47. P. 583–595.
5. *Ezhova O.V., Malakhov V.V.* The nephridial hypothesis of the gill slit origin // *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. 2015. № 324B. P. 647–652.
6. *Иванов П.П.* Первичная и вторичная метамерия тела // *Журнал общей биологии.* 1944. Т. 5. Вып. 1. С. 61–94.
7. *Светлов П.Г.* О первичной гетерономии состава тела позвоночных (к 15-летию со дня смерти П.П. Иванова) // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии.* 1957. Т. 34. № 2. С. 3–22.
8. *Иванова-Казас О.М.* Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных: Иглокожие и полухордовые. М.: Наука, 1978. 164 с.
9. *MacBride E.W.* Text-book of embryology. Vol. I: Invertebrates. London: Macmillan & Co, 1914. 692 p.
10. *Gemmill J. F.* The development of the starfish *Solaster endeca* Forbes // *Trans. Zool. Soc. London.* 1912. V. 20. № 1. P. 1–71.
11. *Smiley S.* Metamorphosis of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea) and its phylogenetic implication // *Biol. Bull.* 1986. V. 171. P. 611–631.
12. *Ezhova O.V., Malakhov V.V.* Axial complex of Crinoidea: comparison with other Ambulacraria // *J. Morph.* 2020. V. 281. № 11. P. 1456–1475.
13. *Малахов В.В.* Проблема происхождения иглокожих в свете данных по их эмбриональному развитию // *Проблемы изучения ископаемых и современных иглокожих.* Таллин: АН Эстонской ССР. Ин-т геологии, 1989. С. 14–23.
14. *Jefferies R.P.S., Brown N.A., Daley P.E.J.* The early phylogeny of chordates and echinoderms and the origin of chordate left-right asymmetry and bilateral symmetry // *Acta Zool. (Stockh).* 1996. V. 77. P. 101–122.
15. *Holland N.D.* The meaning of developmental asymmetry for echinoderm evolution: A new interpretation // *In Echinoderm phylogeny and evolutionary biology (Paul C.R.C., Smith A.B., eds.).* Oxford: Clarendon Press, 1988. P. 13–25.

## COELOMIC SYSTEM OF THE SEA URCHIN *STRONGYLOCENTROTUS PALLIDUS* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA) AND THE PROBLEM OF COELOMIC METAMERISM IN ECHINODERMS

O. V. Ezhova<sup>a, #</sup>, J. A. Kokurkina<sup>a</sup>, K. I. Belolubskaya<sup>a</sup>, and Academician of the RAS V. V. Malakhov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: olga.ejova@gmail.com*

The representatives of the main phylogenetic clades of Bilateria have metamerism. Among Deuterostomia, metamerism is characteristic of hemichordates and chordates. It is shown that sea urchins have 7 metameric coelomic rings located along the oral-aboral axis of the body. A similar coelomic metamerism is also characteristic of representatives of other classes of echinoderms. A hypothesis has been proposed according to which the metameric coelomic rings of echinoderms are a legacy of metamerism inherent in the common ancestor of Deuterostomia. Dissymmetry in the structure of echinoderm coeloms is the result of ancestral forms lying on the right side, which led to a reduction of the coeloms on the right side. During a sedentary lifestyle, the left coeloms formed metameric coelomic rings.

*Keywords:* metamerism, coeloms, dissymmetry, origin of echinoderms