СОДЕРЖАНИЕ

Том 503, 2022

Первые данные о следах микроизноса неокклюзиальной поверхности резцов пещерных медведей Урала

Д. О. Гимранов, С. В. Зыков, П. А. Косинцев 113

Динамика авифауны западной Кубы в позднечетвертичное время (по материалам из пещеры Эль-Аброн)

Н. В. Зеленков, Е. С. Беличенко 117

Вирио- и бактериопланктон прибрежных вод реки Москвы

И. В. Мошарова, В. В. Ильинский, И. А. Козлова, А. Ю. Акулова, К. П. Хазанова, С. А. Мошаров 121

Сезонная динамика и закономерности поворотной активности участков ствола деревьев сосны обыкновенной

С. А. Шавнин, Д. Ю. Голиков, А. А. Монтиле 127

Первая находка трематод (Digenea) в глубоководных кишечнодышащих Torquaratoridae (Hemichordata, Enteropneusta)

О. В. Ежова, К. И. Белолюбская, Д. Ю. Крупенко, А. И. Лукиных, В. В. Малахов 133

Синтетические аналоги 6-бромогипафорина, природного агониста никотиновых холинорецепторов, уменьшают реперфузионное повреждение сердца в модели ишемии миокарда у крыс

Э. Р. Шайхутдинова, А. Е. Кондрахина, И. А. Иванов, Д. С. Кудрявцев, И. А. Дьяченко, А. Н. Мурашев, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин 138

Получение фторсодержащих аналогов пуриновых дезоксинуклеозидов: оптимизация условий ферментативного трансгликозилирования

М. С. Дреничев, Е. О. Доринова, И. В. Варижук, В. Е. Ословский, М. А. Варга, Р. С. Есипов, Д. Д. Лыкошин, К. С. Алексеев 144

Антимикробная активность липидных экстрактов иглокожих залива Нячанг (Южно-Китайское море)

Е. С. Обухова, А. М. Рожина, В. П. Воронин, П. Ю. Дгебуадзе, С. А. Мурзина 152

Разработка низкомолекулярного аллостерического агониста рецептора тиреотропного гормона с тиреоидогенной активностью

А. А. Бахтюков, К. В. Деркач, Е. А. Фокина, В. Н. Сорокоумов, И. О. Захарова, Л. В. Баюнова, А. О. Шпаков 161

Прогностическая значимость белков-регуляторов сплайсинга РНК для пациентов с глиобластомой

Т. Д. Ларионова, Т. Ф. Коваленко, М. И. Шахпаронов, М. С. Павлюков 166

5-азацитидин подавляет экспрессию тканеспецифических изоформ Oct-1 в В-клеточной лимфобластной линии Namalwa

А. П. Котнова, А. Г. Степченко, Ю. В. Ильин, С. Г. Георгиева, Е. В. Панкратова 172

Обнаружение и некоторые свойства стимулятора светоизлучения базидиомицета *Neonothopanus nambi*

Н. О. Ронжин, Е. Д. Посохина, О. А. Могильная, В. С. Бондарь 177

Влияние гамма-излучения на цитогенетические и ростовые параметры проростков *Allium cepa* в длительных экспериментах

А. Я. Болсуновский, Е. А. Трофимова, А. В. Зуева, Д. В. Дементьев, М. В. Петриченков 183

Среди антителоподобных молекул, монободи, способных взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV, есть монободи с высоким сродством к нуклеокапсидному белку вируса SARS-CoV-2

Ю. В. Храмцов, А. В. Уласов, Т. Н. Лупанова, Г. П. Георгиев, А. С. Соболев 189

Влияние анестезии на послеоперационную боль у пациентов после септопластики

И. К. Калмыков, Г. М. Мурадов, И. В. Решетов, А. А. Цымбал 192

Сравнительное исследование влияния ядов змей на рост инфузорий *Tetrahymena pyriformis*: идентификация ядов с высокой антипротозойной активностью

Е. Г. Черемных, А. В. Осипов, В. Г. Старков, Ч. Т. Т. Нгуен (Nguyen Thi Thuy Trang), Х. К. Нгуен (Nguyen Cuu Khoa), А. Н. Хоанг (Hoang Ngoc Anh), З. Т. Ле (Le Tien Dung), В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин 197

Пренатальный стресс и адаптивное поведение потомков: роль плацентарного серотонина

Н. С. Бондаренко, С. Н. Воронова, Е. Е. Воронежская, В. И. Мельникова 203

Рождение новой изоформы POU2F1 у приматов за счет использования мобильных генетических элементов

Б. М. Льянова, А. П. Котнова, А. А. Макарова, Ю. В. Ильин, С. Г. Георгиева, А. Г. Степченко, Е. В. Панкратова 208

Сложные эфиры орто-фталевой кислоты в спонтанных опухолях животных

Е. А. Лозовская, С. Б. Никифоров, А. Г. Еникеев, К. Ю. Костюнин, Н. П. Судаков, А. А. Семенов 213

CONTENTS

Vol. 503, 2022

First Data on the Non-occlusal Surface Incisor Microwear of Cave Bears of the Urals

D. O. Gimranov, S. V. Zykov, and P. A. Kosintsev 113

Dynamics of Western Cuba Avifauna in the Late Quaternary (based on materials from El Abròn Cave)

N. V. Zelenkov and E. S. Belichenko 117

VIRIO- and Bacterioplankton of the Coastal Water of the Moscow River

I. V. Mosharova, V. V. Ilinskiy, I. A. Kozlova, A. Y. Akylova, K. P. Hazanova, and S. A. Mosharov 121

Seasonal Dynamics and Regularities of Scots Pine Tree Trunk Sections Rotation Activity

S. A. Shavnin, D. Yu. Golikov, and A. A. Montile 127

The First Discovery of Trematodes (Digenea) in Deep-sea Acorn Worms Torquaratoridae (Hemichordata, Enteropneusta)

O. V. Ezhova, K. I. Belolubskaya, D. Y. Krupenko, A. I. Lukinykh, and V. V. Malakhov 133

Synthetic Analogs of 6-bromohypaphorine, a Natural Agonist of Nicotinic Acetylcholine Receptors, Reduce Cardiac Reperfusion Injury in a Rat Model of Myocardial Ischemia

E. R. Shaykhutdinova, A. E. Kondrakhina, I. A. Ivanov, D. S. Kudryavtsev, I. A. Dyachenko, A. N. Murashev, V. I.Tsetlin, and Yu. N. Utkin 138

Synthesis of Fluorine-containing Analogues of Purine Deoxinucleosides: Optimization of Enzymatic Transglycosylation Conditions

M. S. Drenichev, E. O. Dorinova, I. V. Varizhuk, V. E. Oslovsky, M. A. Varga, R. S. Esipov, D. D. Lykoshin, and C. S. Alexeev 144

Antimicrobial Activity of Lipid Extracts of Echinoderms in the Nhatrang Bay (South China Sea)

E. S. Obukhova, A. M. Rozhina, V. P. Voronin, P. Yu. Dgebuadze, and S. A. Murzina 152

Development of Low-molecular-weight Allosteric Agonist of Thyroid-stimulating Hormone Receptor with Thyroidogenic Activity

A. A. Bakhtyukov, K. V. Derkach, E. A. Fokina, V. N. Sorokoumov, I. O. Zakharova, L. V. Bayunova, and A. O. Shpakov 161

The Prognostic Significance of Spliceosomal Proteins for Patients with Glioblastoma

T. D. Larionova, T. F. Kovalenko, M. I. Shakhparonov, and M. S. Pavlyukov 166

5-azacytidine Suppresses the Expression of Tissue-specific OCT-1 Isoform in NAMALWA Burkitt's Lymphoma Cell Culture

A. P. Kotnova, A. G. Stepchenko, Yu. V. Ilyin, S. G. Georgieva, and E. V. Pankratova 172

Finding the Light Emission Stimulator of Neonothopanus nambi Basidiomycete and Studying its Properties

N. O. Ronzhin, E. D. Posokhina, O. A. Mogilnaya, and V. S. Bondar 177

Effect of Gamma Radiation on Cytogenetic and Growth Endpoints of *Allium cepa* Seedlings in Long-term Experiments

A. Ya. Bolsunovsky, E. A. Trofimova, A. V. Zuava, D. V. Dementyev, and M. V. Petrichenkov 183

Among Antibody-like Molecules, Monobodies, Able to Interact with Nucleocapsid Protein of SARS-COV virus, there are Monobodies with High Affinity to Nucleocapsid Protein of SARS-COV-2 Virus

Y. V. Khramtsov, A. V. Ulasov, T. N. Lupanova, G. P. Georgiev, and A. S. Sobolev 189

Effect of Anesthesia on Postoperative Pain in Patients after Septoplasty

I. K. Kalmykov, G. M. Muradov, I. V. Reshetov, and A. A. Tsymbal 192

Comparative Study of the Effect of Snake Venoms on the Growth of Ciliates Tetrahymena Pyriformis: Identification of Venoms with High Antiprotozoal Activity

E. G. Cheremnykh, A. V. Osipov, V. G. Starkov, Nguyen Thi Thuy Trang, Nguyen Cuu Khoa, Hoang Ngoc Anh, Le Tien Dung, V. I. Tsetlin, and Yu. N. Utkin 197

Prenatal Stress and Adaptive Behavior of Offspring: the Role of Placental Serotonin

N. S. Bondarenko, S. N. Voronova, E. E. Voronezhskaya, and V. I. Melnikova 203

The Birth of a New Isoform of POU2F1 in Primates Through the Use of Egoistic Mobile Genetic Elements

B. M. Lyanova, A. P. Kotnova, A. A. Makarova, Yu.V. Ilyin, S. G. Georgieva, A. G. Stepchenko, and E. V. Pankratova 208

Complexes of Orthothalic Acid in Spontaneous Animal Tumors

E. A. Lozovskaya, S. B. Nikiforov, A. G. Enikeev, K. Yu. Kostyunin, N. P. Sudakov, and A. A. Semenov 213

EDN: WPGNNM
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 113–116

УДК 599.742.2:591.431.4(470.5)

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О СЛЕДАХ МИКРОИЗНОСА НЕОККЛЮЗИАЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ РЕЗЦОВ ПЕЩЕРНЫХ МЕДВЕДЕЙ УРАЛА

© 2022 г. Д. О. Гимранов[1,2,*], С. В. Зыков[1], П. А. Косинцев[1]

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным
Поступило 29.11.2021 г.
После доработки 21.12.2021 г.
Принято к публикации 21.12.2021 г.

Проведен сравнительный анализ микроизноса неокклюзиальной поверхности резцов (I1, I2) малого (*Ursus* ex gr. *savini-rossicus*) и уральского (*Ursus kanivetz*) пещерных медведей из плейстоценовых отложений Среднего и Южного Урала. Выявлены межвидовые различия в качественных характеристиках элементов микроизноса резцов. У малого пещерного медведя отмечены более грубые повреждения на неокклюзиальной поверхности резцов. С учетом специфики микроизноса неокклюзиальных поверхностей зубов на основании полученных данных сделаны предположения о различиях в трофической специализации изученных видов.

Ключевые слова: Ursus savini, *Ursus rossicus*, *Ursus kanivetz*, малый пещерный медведь, уральский пещерный медведь, плейстоцен, верхний резец, Урал, микроизнос

DOI: 10.31857/S2686738922020093

Согласно современным морфологическим и молекулярным данным на Урале в позднем плейстоцене обитало два вида пещерных медведей [1, 2]. Это большой, или уральский, пещерный медведь (*Ursus kanivetz* Verestchagin, 1973) и малый, или русский, пещерный медведь (*U. rossicus* Borissiak, 1930). На сегодняшний день группа малых пещерных медведей нуждается в ревизии [2]. В данной работе мы рассматриваем малого пещерного медведя как принадлежащего к группе *savini-rossicus* (*U.* ex gr. *savini-rossicus*).

Малый пещерный медведь по сравнению с большим пещерным медведем является плохо изученным видом. Работы, касающиеся особенностей экологии малого пещерного медведя, очень редки [3–6], исследования диеты единичны [7]. Одним из методов изучения особенностей питания млекопитающих является анализ следов микроизноса зубов. В настоящее время на основе анализа микроизноса зубов проведены реконструкции диеты представителей различных отрядов млекопитающих [8–12]. Особый интерес в данном направлении представляет анализ микроизноса неокклюзиальных поверхностей зубов. Исследования микроизноса буккальных и лабиальных поверхностей зубов приматов показали важность данного подхода не только к выяснению состава диеты, но и реконструкции пищевого поведения [7, 13–15]. Пищевые предпочтения ряда видов медведей также изучены с использованием метода анализа микроизноса зубов [7, 10, 12, 16]. Однако сведения о микроповреждениях и износе резцов пещерных медведей в литературе крайне скудны.

Целью данной работы была оценка качественных и количественных характеристик микроизноса лабиальных поверхностей резцов у малого и большого пещерных медведей с территории Уральского региона. Для анализа микроследов нами были выбраны верхние первый (I1) и второй (I2) резцы. В изолированном состоянии отличить первый от второго резца у пещерных медведей достаточно затруднительно. Эти зубы прорезаются в одно время и стираются синхронно, поэтому далее рассматриваем эти резцы вместе. Были выбраны резцы со среднем уровнем стертости, когда достаточно сильно обнажается дентин верхней части коронки, но зуб стерт не более чем на 1/3. Исследовано 10 верхних резцов (I1–2), принадлежащие малому пещерному медведю и происходящих из позднеплейстоценового местонахождения пещера Иманай. Резцы большого пещерного медведя (n = 11 экз.) происходят из пещер Тайн (n = 2), Игнатьевская (n = 3), Заповедная (n = 3) и

[1]*Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия*
[2]*Уральский федеральный университет им. первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия*
**e-mail: djulfa250@rambler.ru*

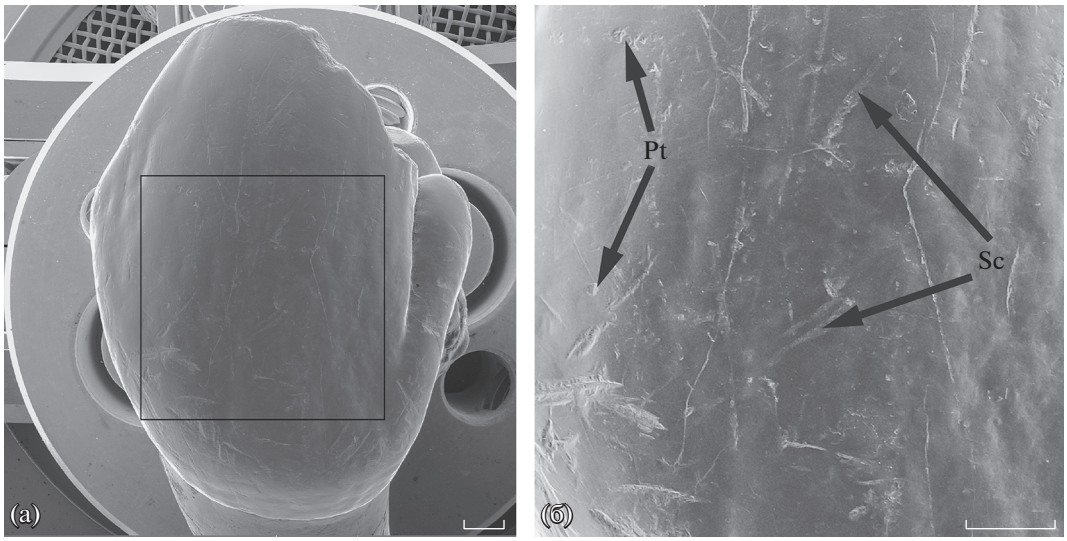


Рис. 1. Общий вид и расположение учетной площади (а) на лабиальной поверхности резца (на примере *U.* ex gr. *savini-rossicus*). Ямки (Pt) и царапины (Sc) на учетной площади (б). Масштаб 1 миллиметр.

Аша 1 ($n = 3$). Пещера Тайн расположена на Среднем Урале, остальные пещеры – на Южном Урале. На основе радиоуглеродных дат и биостратиграфических данных все местонахождения с остатками пещерных медведей датируются началом и серединой (морская изотопная стадия (МИС) 5 – МИС 3) позднего плейстоцена [2].

Анализ микроизноса проводили на лабиальной поверхности резцов на микрофотографиях, полученных при увеличении ×30 на электронном сканирующем микроскопе TESCAN VEGA3. Количественный и качественных анализ элементов микроизноса зубов проводился на площади 6 мм^2 с использованием полуавтоматической программы Microwear 4.02 (Ungar, 1994–2002, США) (рис. 1). Оценку межвидовых различий микроизноса проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), используя программу STATISTICA 8.0. (“StatSoft, Inc.”, 1984–2007, США).

В результате проведенного анализа не выявлено значимых межвидовых различий в количестве микроповреждений на лабиальной поверхности резцов у двух видов пещерных медведей (рис. 2). Наблюдается общий тренд к уменьшению количества элементов микроизноса эмалевой поверхности у большого пещерного медведя. Среднее количество ямок/царапин у малого медведя составило 15.8/54.6, у большого пещерного медведя 7/37.2 соответственно (рис. 2б), однако различия и по числу ямок ($F(1; 19) = 4.13$, $p > 0.05$) так и по числу царапин ($F(1;19) = 3.88$, $p > 0.05$) оказались незначимы.

Межвидовые различия были выявлены по ширине ямок/царапин на эмали. Среднее значение ширины ямок/царапин у малого пещерного медведя составило 99.9/59.1, у большого пещерного медведя 74.11/42.0 микрометров соответственно (рис. 2а). Различия по ширине ямок ($F(1;19) = 7.38$, $p < 0.05$) и царапин ($F(1;19) = 18.74$, $p < 0.001$) статистически достоверны. На лабиальной поверхности резцов малого пещерного медведя повреждения носят более грубый характер, ширина и ямок и царапин превышает значения аналогичных элементов у большого пещерного медведя (рис. 2а).

В результате проведенного анализа микроповреждений эмали зубов, который широко используется в палеореконструкциях трофических особенностей наземных млекопитающих, установлены значимые статистические различия по размерам микроследов на неокклюзиальной поверхности резцов большого и малого пещерных медведей.

На данный момент интерпретация микроизноса зубов медведей имеет дискуссионный характер. На основе анализа следов микроизноса окклюзиальных поверхностей моляров делались выводы о большей плотоядности пещерного медведя по сравнению с бурым [17], всеядности [18], смешанной диеты [19]. Учитывая последние данные комплексного анализа палеодиеты на основе изотопного анализа и микроизноса моляров, мы придерживаемся гипотезы о растительной диете пещерных медведей [20].

Ранее было отмечено, что количество грубых повреждений на окклюзиальной поверхности моляров у большого пещерного медведя больше по сравнению с малым, что может свидетельствовать о различиях в составе кормов [7]. Учитывая полученные нами результаты по размерным характеристикам повреждений на резцах данных видов, можно предположить, что при добывании корма

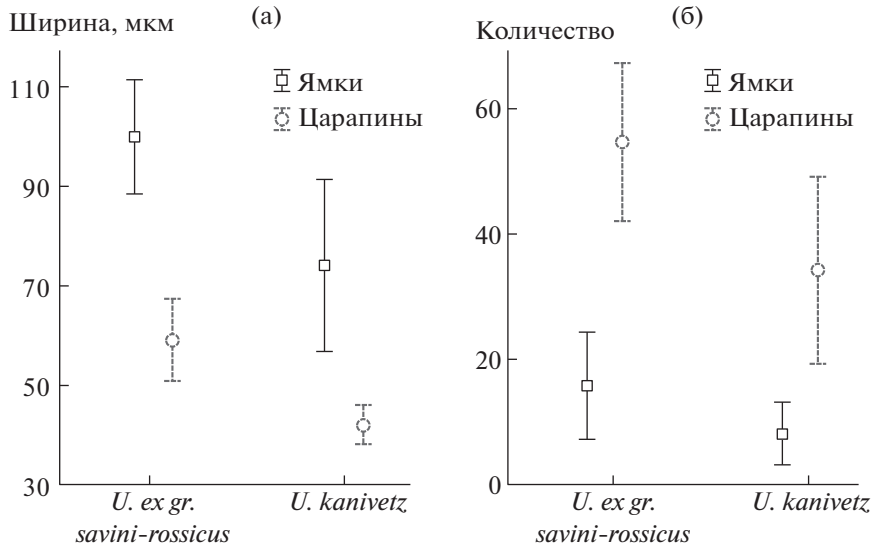


Рис. 2. Средние значения и доверительный интервал ширины (а) и общего числа (б) ямок и царапин лабиальной поверхности резцов малого и большого пещерных медведей.

на резцы малого пещерного медведя оказывалось более грубое воздействие, что возможно связано как с субстратом, на котором произрастали кормовые растения, так и со смещением растительноядной диеты малого пещерного медведя в сторону ризофагии.

Различия характеристик элементов микроизноса лабиальных поверхностей резцом изученных видов в совокупности с данными по микроизносу окклюзиальных поверхностей моляров [7] свидетельствуют о разнице в составе кормов и/или пищевом поведении данных видов. Для более полного описания различий в питании и пищевых предпочтениях пещерных медведей необходимо проведение комплексного анализа микро- и макроизноса поверхностей нижних резцов, клыков и щечных зубов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00041). Исследование выполнено с использованием оборудования ИЭРиЖ УрО РАН и УЦКП “Современные нанотехнологии” ИЕНиМ УрФУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barlow A., Paijmans J.L.A., Federica A., et al.* Middle Pleistocene genome calibrates a revised evolutionary history of extinct cave bears // Current Biology. 2021. V. 31. № 8 P. 1771–1779.
2. *Гимранов Д.О., Косинцев П.А.* Пещерные медведи (*Ursus spelaeus* sensu lato) Урала // Палеонтологический журнал. 2022. № 1. С. 97–106.
3. *Борисяк А.А.* Новая раса пещерного медведя из четвертичных отложений Сев. Кавказа // Труды палеозоологического института. 1932. Т. 1. С. 137–201.
4. *Vereschagin N., Baryshnikov G.* Small cave bear *Ursus* (Spelearctos) *rossicus uralensis* from the Kizel Cave in the Ural (Russia) // Geoloski zbornik, Liubljana. 2000. V. 15. P. 53–66.
5. *Барышников Г.Ф.* Семейство медвежьих (Carnivora, Ursidae). СПб.: Наука; 2007.
6. *Spassov N., Hristova L., Ivanova S., Georgiev I.* First record of the “small cave bear” in Bulgaria and the taxonomic status of bears of the *Ursus savini* Andrews – *Ursus rossicus* Borissiak group // Fossil Imprint. 2017. V. 73. P. 275–291.
7. *Ramirez Pedraza I., Baryshnikov G.F., Prilepskaya N.E., Belyaev R.I., et al.* Paleodiet and niche partitioning among the easternmost European cave bears based on tooth wear analysis // Historical Biology. 2021. P. 1–9.
8. *Ungar P.S.* Dental microwear of European Miocene catarrhines: evidence for diets and tooth use // J. Hum. Evol. 1996. V. 31. P. 335–366.
9. *Nelson S., Badgley C., Zakem E.* Microwear in modern squirrels in relation to diet // Palaeontol. Electron. 2005. V. 8. № 1. P. 14A: 15 p.
10. *Pinto-Llona A.C.* Macrowear and occlusal microwear on teeth of cave bears *Ursus spelaeus* and brown bears *Ursus arctos*: Inferences concerning diet // Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 2013. V. 370. P. 41–50.
11. *Merceron G., Schulz E., Kordos L., et al.* Paleoenvironment of *Dryopithecus brancoi* at Rudabánya, Hungary: evidence from dental meso-and micro-wear analyses of large vegetarian mammals // J. Hum. Evol. 2007. V. 53. № 4. P. 331–349.
12. *Peigne S., Merceron G.* Palaeoecology of cave bears as evidenced by dental wear analysis: a review of methods

and recent findings // Historical Biology. 2019. V. 31. № 4. P. 448–460.

13. *Ungar P.S., Teaford M.F.* Preliminary examination of non-occlusal dental microwear in anthropoids: implications for the study of fossil primates // Am. J. Phys. Anthropol. 1996. V. 100. № 1. P. 101–113.
14. *Perez-Perez A., Espurz V., Bermudez de Castro J.M., et al.* Non-occlusal dental microwear variability in a sample of Middle and Late Pleistocene human populations from Europe and the Near East // J. Hum. Evol. 2003. V. 44. № 4. P. 497–513.
15. *Romero A., Galbany J., De Juan J., et al.* Brief communication: Short- and long-term in vivo human buccal-dental microwear turnover // Am. J. Phys. Anthropol. 2012. V. 148. № 3. P. 467–472.
16. *Pappa S., Schreve D.C., Rivals F.* The bear necessities: A new dental microwear database for the interpretation of palaeodiet in fossil Ursidae // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 2019. V. 514. P. 168–188.
17. *Pinto Llona A.C.* Comparative dental microwear analysis of cave bears *Ursus spelaeus* Rosenmuller, 1794 and brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758. // Sci. Annals. Geol. School. 2006. V. 98. P. 103–108.
18. *Donohue S.L., DeSantis L.R.G., Schubert B.W., et al.* Was the Giant Short-Faced Bear a Hyper-Scavenger? A New Approach to the Dietary Study of Ursids Using Dental Microwear Textures // PLOS One. 2013. V. 8. № 10. P. e77531.
19. *Jones D.B., Desantis L.R.G.* Dietary ecology of ungulates from the La Brea tar pits in southern California: a multi-proxy approach // Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology. 2017. V. 466. P. 110–127.
20. *Bocherens H.* Isotopic insights on cave bear palaeodiet // Historical Biology. 2019. V. 31. № 4. P. 410–421.

FIRST DATA ON THE NON-OCCLUSAL SURFACE INCISOR MICROWEAR OF CAVE BEARS OF THE URALS

D. O. Gimranov[a,b,#], S. V. Zykov[a], and P. A. Kosintsev[a]

[a] *Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*
[a] *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education*
"Ural Federal University named after the first President of Russia B.N.Yeltsin", Yekaterinburg, Russian Federation
[#] *e-mail: djulfa250@rambler.ru*

Presented by Academician of the RAS A.V. Lopatin

A comparative analysis of the microwear of the non-occlusal surface of incisors (I1, I2) of small and Ural cave bears from Pleistocene deposits of the Middle and Southern Urals was carried out. Interspecies differences in the qualitative characteristics of incisor microwear variables were revealed. In the small cave bear, coarser lesions on the non-occlusal surface of the incisors were observed. Taking into account the specificity of microwear of non-occlusal tooth surfaces, on the basis of the obtained data were made assumptions about differences in trophic specialization of the studied species.

Keywords: Ursus savini, *Ursus rossicus*, *Ursus kanivetz*, small cave bear, Ural cave bear, Pleistocene, lower incisor, Ural, microwear

EDN: PDEZGX
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 117–120

УДК 551.79:568.2

ДИНАМИКА АВИФАУНЫ ЗАПАДНОЙ КУБЫ В ПОЗДНЕЧЕТВЕРТИЧНОЕ ВРЕМЯ (ПО МАТЕРИАЛАМ ИЗ ПЕЩЕРЫ ЭЛЬ-АБРОН)

© 2022 г. Н. В. Зеленков[1,*], Е. С. Беличенко[1]

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным
Поступило 22.10.2021 г.
После доработки 09.12.2021 г.
Принято к публикации 09.12.2021 г.

По материалам из пещерного местонахождения Эль-Аброн на западе Кубы впервые проанализирована динамика таксономического разнообразия птиц острова в позднем плейстоцене – голоцене. Для верхнеплейстоценовых слоев местонахождения характерны богатство таксономического разнообразия птиц и обилие обитателей околоводных и открытых ландшафтов. Для голоцена регистрируются общее сокращение таксономического разнообразия и значительный рост числа остатков представителей лесных фаун (Picidae). Полученные данные свидетельствуют о существенном преобразовании ландшафтов западной Кубы и населявших их ассоциаций птиц в конце четвертичного периода, что согласуется с палеоклиматическими данными.

Ключевые слова: ископаемые птицы, Вест-Индия, поздний плейстоцен, голоцен, трансформация фаун
DOI: 10.31857/S2686738922020202

Карибские острова – географический регион, имеющий большое значение как с позиций исторической биогеографии неотропической биоты, так и для понимания глобальной эволюции тропических экосистем. В состав современной фауны островов входит ряд эндемичных таксонов – представителей реликтовых групп позвоночных, становление которых связано, по меньшей мере, с палеогеном (например, рептилии Cadeidae, млекопитающие Solenodontidae, птицы Todidae). Общий облик фауны позвоночных Карибских островов существенно преобразился в позднечетвертичное время, когда, в результате беспрецедентного голоценового вымирания [1] исчезли многие представители реликтовых сообществ (в первую очередь, млекопитающие). Позднеплейстоценовые и раннеголоценовые фауны птиц Кубы, самого крупного из Карибских островов, также включали заметное число вымерших видов [2] и, таким образом, сильно отличались от современных. При этом ранее не предпринималось попыток непосредственно сопоставить позднечетвертичные и современные авифауны острова. В этой работе нами впервые проанализировано изменение таксономического разнообразия птиц Кубы в позднечетвертичное время на примере репрезентативного тафоценоза из одного пещерного местонахождения.

Нами изучены материалы по птицам из пещеры Эль-Аброн – одного из богатейших палеонтологических местонахождений Кубы. Пещера располагается в горном массиве Сьерра-де-ла-Гуира на западе острова (провинция Пинар-дель-Рио) и довольно труднодоступна, в результате чего в ней сохранились нетронутые многометровые отложения позднечетвертичного возраста, богатые ископаемыми остатками позвоночных [3]. В сборах из пещеры Эль-Аброн преобладают кости млекопитающих (насекомоядных, рукокрылых и грызунов), но также довольно обычны кости рептилий, амфибий и птиц – в том числе, представителей вымерших видов [3–11].

Предполагается, что основным фактором накоплений костей в пещере Эль-Аброн являлась жизнедеятельность сипух *Tyto* [3, 6]. В то же время в отложениях пещеры нередки кости и других видов хищных птиц [6, 10]: сов мелкого и среднего размера (*Margarobyas* spp., *Athene cunicularia*, *Glaucidium* sp.), а также мелких соколов и ястребов (*Falco* spp., *Accipiter* sp.). Таким образом, агентом формирования накоплений был комплекс нескольких видов некрупных хищников. Жертвами неузкоспециализированных хищных птиц (не стенофагов) в первую очередь становятся самые распространенные виды, поэтому присутствие костей определенных таксонов может служить индикатором их относительного обилия в окрест-

[1]*Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва, Россия*
**e-mail: nzelen@paleo.ru*

Таблица 1. Послойное распределение изученных материалов по отдельным группам птиц из пещеры Эль-Аброн (Западная Куба): общее число костей и минимальное число индивидов (в скобках)

Слои / Группы птиц	0	II	III/IV	V	V/VI	VI	VII	IX
Anatidae					1 (1)			
Odontophoridae	1							
Columbidae	16	8 (2)	2 (1)	10 (3)	1 (1)		17 (6)	1 (1)
Caprimulgidae		1 (1)	1 (1)	2 (1)		1 (1)	2 (1)	1 (1)
Apodidae				2 (2)		3 (1)	2 (2)	1 (1)
Cuculidae	1							
Rallidae	1	4 (1)	1 (1)	7 (3)		1 (1)	13 (6)	
Scolopacidae	1		3 (2)		1 (1)	2 (2)	11 (4)	
Cathartidae	10							
Accipitridae		2 (1)		2 (1)		1 (1)		
Strigiformes	13	42 (8)		5 (2)		3 (2)	52 (20)	
Trogonidae	2	1 (1)	1 (1)	5 (2)		1 (1)	4 (2)	
Picidae	44	279 (30)	5 (2)	4 (1)			2 (1)	1 (1)
Todidae							1 (1)	
Falconidae	1	1 (1)					1 (1)	
Psittacidae					1 (1)	1 (1)	3 (3)	
Passeriformes	140 (26)	305 (61)	49 (9)	304 (40)	36 (5)	174 (26)	301 (96)	52 (9)

ностях пещеры во время формирования соответствующего слоя. Послойное изменение таксономического состава представленных в выборке птиц отражает изменение рациона и состава хищников, что в данной работе рассматривается как свидетельство динамики фауны и населения птиц в окрестностях пещеры.

При раскопках в пещере были вскрыты отложения глубиной до 2.85 м и было выделено 9 слоев [3, 11]. Для мощного слоя VII (глубина залегания 0.8–1.72 м) получена радиоуглеродная датировка 17406 ± 161 л. н. (с учетом калибрации: 20050–21474 л. н.), свидетельствующая о его позднеплейстоценовом возрасте [3]. Вышележащие слои V и VI (0.45–0.8 м) по фауне и сохранности материала сходны со слоем VII и, по-видимому, также относятся к позднему плейстоцену [9] или, по меньшей мере, к началу голоцена. Приповерхностный слой II (глубина 0.05–0.15 м) сильно отличается по составу фауны (см. ниже) и типу сохранности костей и, очевидно, имеет позднеголоценовый возраст.

В рамках данного исследования было определено около 1700 костей из слоев II, III/IV, V, VI, VII и IX, а также с поверхности пещеры Эль-Аброн. Наиболее репрезентативные материалы получены для слоев VII и II (406 и 610 костей соответственно). Представители воробьеобразных (Passeriformes) и совообразных (Strigiformes) рассматривались без учета подотрядной и семейственной принадлежности; в остальных случаях мы оперировали семействами (табл. 1).

В слоях VII и II многочисленны кости воробьиных (47% в слое II и 74% в слое VII), но в слое II наряду с воробьиными доминируют остатки дятловых (Picidae; 43%), которых в слое VII практически нет (0.5%). Материалы по птицам из слоя VII характеризуются в целом высоким таксономическим разнообразием по сравнению со слоем II: кроме воробьеобразных и дятловых, присутствуют стрижиные (Apodidae), голубиные (Columbidae), попугаевые (Psittacidae), тодиевые (Todidae), трогоновые (Trogonidae), соколиные (Falconidae), ястребиные (Accipitridae), совообразные, козодоевые (Caprimulgidae), бекасовые (Scolopacidae) и пастушковые (Rallidae). Из этих групп относительно обильны совообразные (13%), голубиные (4%), пастушковые и бекасовые (по 3%). В слое II, помимо доминирующих групп, присутствуют совообразные (7%), голубиные (1%) и пастушковые (0.6%); также определены единичные кости трогоновых, козодоевых, соколиных и ястребиных.

В материалах с поверхности, так же как и в слое II, доминируют воробьеобразные птицы и дятловые. В меньшем количестве присутствуют кости совообразных, голубиных, пастушковых, соколиных и трогоновых. Обилие дятлообразных при отсутствии остатков стрижиных, козодоевых и попугаев сближает поверхностный слой со слоем II. Важно отметить, что только на поверхности

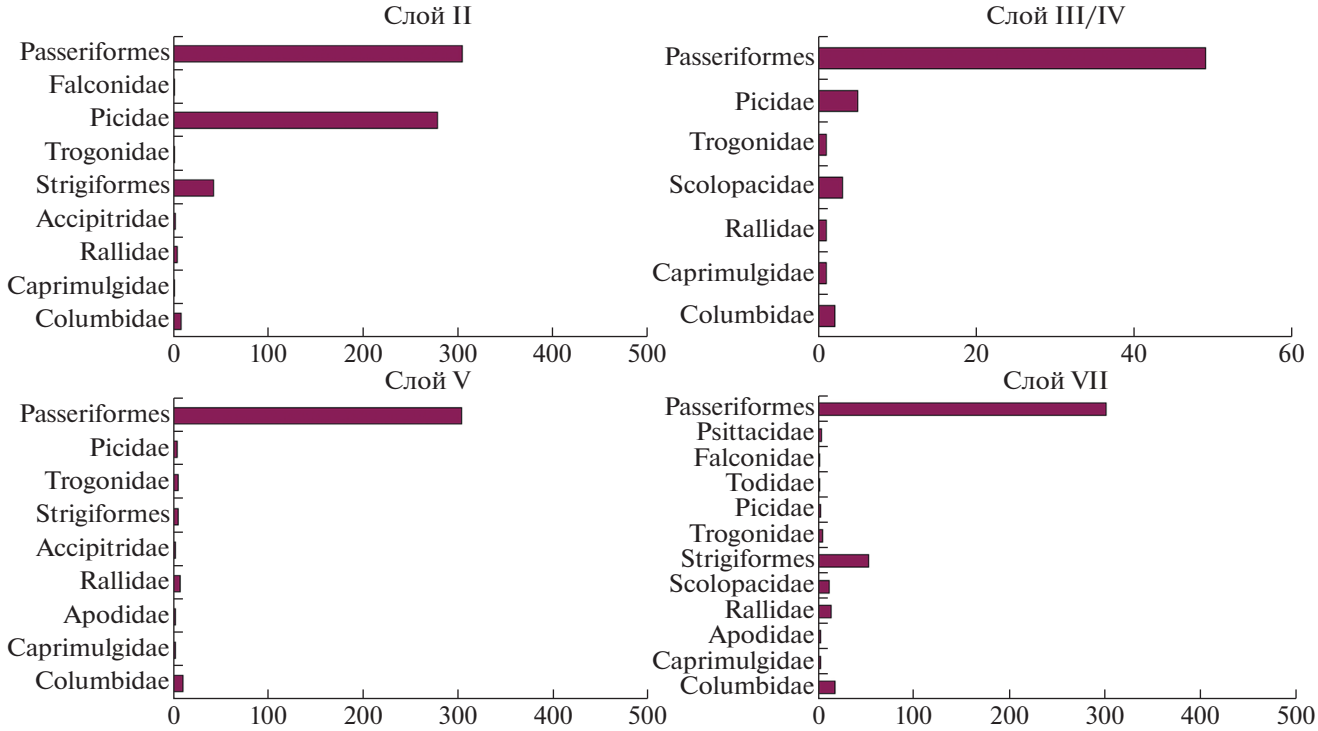


Рис. 1. Обилие (по числу костей) отдельных групп птиц в различных слоях пещеры Эль-Аброн (Западная Куба).

были обнаружены кости зубчатоклювых куропаток (Odontophoridae), кукушковых (Cuculidae) и грифов-индеек (Cathartidae) – характерных представителей современной авифауны Кубы.

Материалы из слоев III–VI позволяют проследить общую динамику авифауны окрестностей пещеры от плейстоцена к современности. В слоях V и VI еще наблюдается довольно высокое таксономическое разнообразие птиц, присутствуют стрижиные и попугаевые; кроме того, из слоя V происходит единственная для местонахождения кость утки (Anatidae). В пограничном интервале слоев III/IV в заметном количестве (6% от общего числа костей) появляются дятловые.

Полученные данные свидетельствуют о существенной реорганизации общей структуры авифауны окрестностей пещеры Эль-Аброн на протяжении позднечетвертичного времени. Очевидны некоторое сокращение таксономического разнообразия и заметный рост числа остатков дятловых в более поздних слоях (III/IV и II, а также поверхность; рис. 1). В древних (плейстоценовых) слоях в заметно большем количестве присутствуют кости обитателей открытых и околоводных ландшафтов (козодоевые, бекасовые, пастушковые, утиные), тогда как в голоценовых слоях остатки представителей этих групп отсутствуют или единичны. Наряду с практически полным отсутствием дятловых это свидетельствует об относительно широкой представленности открытых (в том числе, околоводных) местообитаний в окрестностях пещеры в позднем плейстоцене, что согласуется с палеоклиматическими данными [12]. В то же время показательно присутствие во всех изученных слоях костей характерных лесных обитателей трогонов, что свидетельствует о сохранении древесной растительности в ближайших окрестностях пещеры (по меньшей мере, на склонах гор) даже в эпизоды наиболее засушливого климата. Эти леса могли служить рефугиумами, в которых архаичные представители фауны острова (в том числе, трогоны) пережили эпохи неблагоприятного климата. Примечательно, что практически во всех слоях, включая приповерхностный слой II, присутствуют кости козодоя *Siphonorhis daiquiri,* известного только по ископаемым остаткам [13]. Это свидетельствует о том, что данный вид продолжал существовать на западе острова, по меньшей мере, до голоцена. Отсутствие в ископаемых материалах из пещеры костей курообразных косвенно подтверждает сложившиеся представления [14] о том, что населяющая Кубу современная виргинская американская куропатка (*Colinus virginianus*) была завезена на остров человеком.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках работы Совместной Российско-Кубинской палеонтологической экспедиции [15] при финансовой поддержке РФФИ и СИТМА (научный проект № 18-54-34004 “Позднечет-

вертичные позвоночные Кубы: реликтовые фауны на пороге голоценового вымирания”). Авторы выражают глубокую благодарность всем членам проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tyrberg T.* Holocene avian extinctions // Holocene Extinctions / Ed. S. T. Turvey. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2009. P. 63–106.
2. *Orihuela J.* An annotated list of late Quaternary extinct birds of Cuba // Ornithologia Neotropical. 2019. V. 30. P. 57–67.
3. *Suárez W., Díaz-Franco S.* A new fossil bat (Chiroptera: Phyllostomidae) from a Quaternary cave in Cuba // Caribbean Journal of Science. 2003. V. 39. P. 371–377.
4. *Лопатин А.В.* Смена зубов у Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) из плейстоцена Кубы // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 497. С. 118–124.
5. *Лопатин А.В.* Аномалии зубной системы у Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) из плейстоцена Кубы // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 497. С. 125–130.
6. *Suárez W.* The enigmatic snipe *Capella* sp. (Aves: Scolopacidae) in the fossil record of Cuba // Caribbean Journal of Science. 2004. V. 40. P. 155–157.
7. *Зеленков Н.В., Гонсалес С.* Первый ископаемый тоди (Aves: Todidae) на Кубе // Палеонтологический журнал. 2020. № 3. С. 93–98.
8. *Syromyatnikova E.V., Aranda E., Gonzalez S.F.* The first fossil record of *Cadea* (Amphisbaenia: Cadeidae) and other amphisbaenian remains from the Upper Pleistocene of Cuba // Journal of Vertebrate Paleontology. 2020. V. 39: e1729167.
9. *Syromyatnikova E., Aranda E., Fiol Gonzalez S.* First insight into the diversity of snakes in the Pleistocene of Cuba // Acta Paleontologica Polonica. 2021. V. 66. P. 395–407.
10. *Zelenkov N.V., González S.F.* A new extinct species of *Margarobyas* (Strigiformes) and the evolutionary history of the endemic Cuban Bare-legged Owl (*M. lawrencii*) // Journal of Vertebrate Paleontology. 2021. https://doi.org/10.1080/02724634.2021.1995869
11. *Suárez W., Díaz-Franco S.* Estudio paleontológico del depósito fosilífero El Abrón, Pinar del Río (Sinopsis de las aves fósiles de Cueva El Abrón, Pinar del Río, Cuba) // Bio-diversidad Paleontológica del Archipiélago Cubano: Bases Cartográficas y Conservacionistas. Informe final del proyecto 022 AMA-CITMA; 074 MNHN. Havana: Museo National de Historia Natural, 2011.
12. *Warken S.F., Scholz D., Spötl Ch. et al.* Caribbean hydroclimate and vegetation history across the last glacial period // Quaternary Science Reviews. 2019. V. 218. P. 75–90.
13. *Suarez W.* Fossil evidence for the occurrence of Cuban poorwill Siphonorhis daiquiri in western Cuba // Cotinga. 2000. V. 14. P. 66–68.
14. *Kirwan G.M., Levesque A., Oberle M., Sharpe C.J.* Birds of the West Indies. Barcelona: Lynx Edicions, 2019.
15. *Зеленков Н.В., Лопатин А.В., Перес Лоренсо Э. и др.* Первые успехи совместной российско-кубинской палеонтологической экспедиции // Вестник РФФИ. 2021. № 3 (111) С. 50–55.

DYNAMICS OF WESTERN CUBA AVIFAUNA IN THE LATE QUATERNARY (BASED ON MATERIALS FROM EL ABRÒN CAVE)

N. V. Zelenkov[a,#] and E. S. Belichenko[a]

[a]*A.A. Borissiak Paleontological institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: nzelen@paleo.ru*

Presented by Academician of the RAS A.V. Lopatin

The dynamics of the taxonomic diversity of birds of Cuba during the Late Pleistocene – Holocene is for the first time assessed using materials from El Abron cave site in the Western part of the island. The Upper Pleistocene layers of the locality are characterized by a rich taxonomic diversity of birds and an abundance of inhabitants of near-water and open landscapes. For the Holocene, a general decrease in taxonomic diversity and a significant increase in the number of remains belonging to representatives of forest faunas (Picidae) are recorded. Our data indicate a significant transformation of the landscapes of Western Cuba and the faunistic associations of birds at the end of the Quaternary, which is consistent with paleoclimatic data.

Keywords: fossil birds, West Indies, Late Pleistocene, Holocene, fauna transformation

EDN: LPZFFC
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 121–126

УДК 578.4

ВИРИО- И БАКТЕРИОПЛАНКТОН ПРИБРЕЖНЫХ ВОД РЕКИ МОСКВЫ

© 2022 г. И. В. Мошарова[2,*], В. В. Ильинский[1], И. А. Козлова[1], А. Ю. Акулова[1], К. П. Хазанова[1], С. А. Мошаров[2]

Представлено академиком РАН М.В. Флинтом
Поступило 20.10.2021 г.
После доработки 30.11.2021 г.
Принято к публикации 01.12.2021 г.

Впервые изучена динамика численности вириопланктона (ЧВ) в прибрежных водах реки Москвы (р. Москвы) в осенне-зимний период на станциях, различающихся по уровню антропогенного воздействия. ЧВ в водах более загрязненной *ст. Дзержинский* (среднее значение $235.6 \pm 71.5 \times 10^6$ частиц/мл, при варьировании от 167.79 до 397.39×10^6 частиц/мл) на протяжении всего периода исследований была выше, чем в водах менее загрязненной *ст. Тушино* (среднее значение $129.0 \pm 39.6 \times 10^6$ частиц/мл, при варьировании от 61.01 до 186.85×10^6 частиц/мл). Между значениями численности вирио- и бактериопланктона в водах *ст. Дзержинский* наблюдалась положительная связь ($R = 0.6$, $p < 0.01$). Полагаем, что значительная доля в составе вириопланктона прибрежных вод р. Москвы представлена бактериофагами. Три четверти различий динамики ЧВ были значимо положительно связаны с содержанием аммония и фосфатов в водах реки на *ст. Дзержинский*. По-видимому, возрастание биогенной нагрузки является основным фактором, обусловливающим высокую ЧВ в водах р. Москвы в осенне-зимний период.

Ключевые слова: вириопланктон, бактериопланктон, бактериофаг, река Москва, антропогенное загрязнение

DOI: 10.31857/S2686738922020159

ВВЕДЕНИЕ

Планктонные вирусные частицы (вирионы) являются самыми мелкими по размеру, но наиболее многочисленными биологическими объектами, которые присутствуют во всех водных экосистемах [1]. Основная экологическая роль вириопланктона в водных экосистемах определяется их способностью инфицировать широкий спектр хозяев, начиная от прокариот (бактерий, архей и цианобактерий) до одноклеточных и многоклеточных эукариот [2]. Показано, что вириопланктон лизирует до 60–100% суточной бактериальной продукции [3, 4]. За последние два десятилетия научное сообщество признало вирусы важным биологическим компонентом в функционировании водных экосистем и заключило, что они являются “основными игроками” в глобальных экосистемах [1, 5].

К настоящему времени экология вириопланктона озер и водохранилищ достаточно хорошо изучена [1, 3, 4], в то же время для рек, особенно протекающих через крупные промышленные города, подобных исследований крайне мало [6]. Вместе с тем реки, а особенно их прибрежные воды, являются “горячими точками” (“hotspots”) биоразнообразия и важными звеньями в глобальных циклах биогенных элементов [2].

Целью нашей работы было исследование динамики численности вирио- и бактериопланктона прибрежной части реки Москвы в экологически важный, но практически не изученный осенне-зимний период. Важность этого направления определяется ролью вирусов в регулировании численности бактерио- и фитопланктона, а также недостатком информации по этой проблеме для крупных рек, протекающих через индустриальные территории.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб воды проводили в период с сентября 2019 г. по март 2020 г. на двух участках реки Москвы (р. Москвы), испытывающих различный уровень антропогенного воздействия. В период с

[1]*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[2]*Институт океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук, Москва, Россия*
**e-mail: ivmpost@mail.ru*

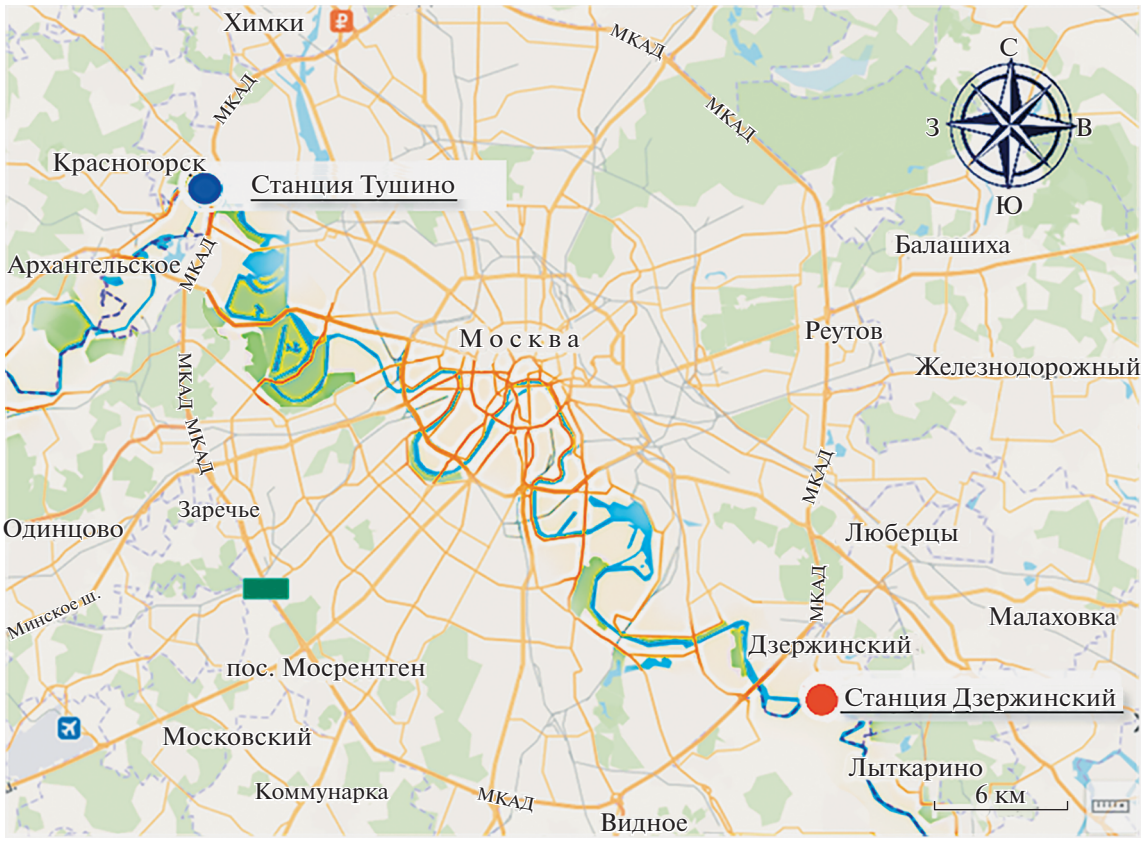


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб на реке Москва. Станции Тушино и Дзержинский отмечены разным цветом: ст. Тушино – синий, ст. Дзержинский – красный.

19.09.2019 по 24.12.19 пробы отбирали два раза в месяц, а в период с января по март 2020 г. – один раз в месяц. В период становления ледяного покрова на ст. Тушино (с 12.12.2019 по 11.03.2020) пробы отбирали из пробитой во льду лунки. Первый участок отбора проб (ст. Тушино) находился в районе Южное Тушино, на входе реки в черту г. Москва. Второй участок (ст. Дзержинский) располагался на выходе реки из г. Москва на юго-востоке, в черте подмосковного города Дзержинский (рис. 1).

Участок реки в районе ст. Дзержинский испытывает хроническое воздействие Курьяновских очистных сооружений (КОС). Отбор проб воды проводился в рипали с глубины 0.5 м. Пробы для определения численности вирио- и бактериопланктона фиксировали сразу на месте отбора 37% раствором безвирусного формальдегида (конечная концентрация – 2% по объему). ЧВ учитывали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа МикМед-3 ЛЮМ LED, предварительно сконцентрировав подпробы воды на фильтрах Anodisc с диаметром пор 0.02 мкм (Whatman International Ltd) и затем окрасив их флуорохромом SYBR Green I [7]. Численность бактериопланктона (ЧБ) определяли также с помощью эпифлуоресцентного микроскопа, сконцентрировав подпробы воды на поликарбонатных фильтрах Nuclepore filter (Whatman Int., Ltd.) с диаметром пор 0.2 μm, предварительно окрасив бактериальные клетки флуорохромом DAPI [8]. Определение концентрации хлорофилла *a* в воде проводили флуориметрическим методом с феофитиновой коррекцией [9] с помощью сертифицированного флуориметра МЕГА-25 [10]. Определение гидрохимических параметров (концентрации аммоний-иона, нитратов, фосфатов) проводили фотометрическим методом [11]. Статистический анализ данных выполнен с использованием программных пакетов PAST v. 4.02. Для анализа данных применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Все приводимые в работе коэффициенты корреляции значимы на уровне $p \leq 0.01$. Значения средних величин представлены с указанием стандартной ошибки (±SE).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидролого-гидрохимические параметры и содержание хлорофилла a

В период проведения исследований температура поверхностного слоя водной толщи на

Рис. 2. Распределение значений численности бактериопланктона (клеток $\times 10^6$ мл$^{-1}$) в прибрежных водах станций Тушино и Дзержинский на реке Москве в период с 19.09.2018 по 11.03.2020.

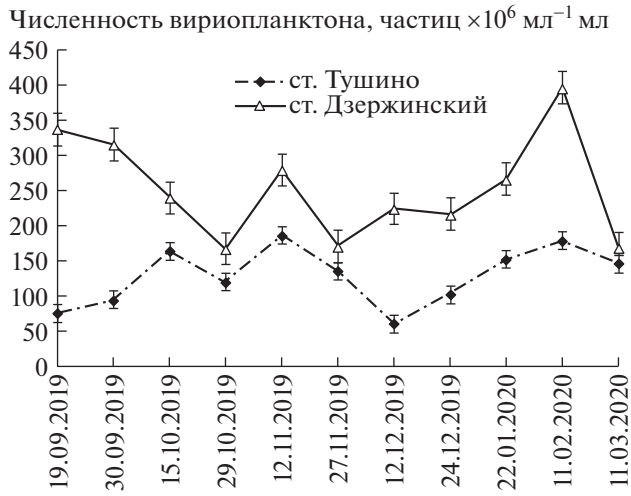


Рис. 3. Распределение значений численности вириопланктона (частиц $\times 10^6$ мл$^{-1}$) в прибрежных водах станций Тушино и Дзержинский на реке Москве в период с 19.09.2018 по 11.03.2020.

ст. Тушино варьировала от 0.4 до 15°С, составляя в среднем 5.5°С. Ледяной покров в Тушино присутствовал в период с 12.12.2019 по 11.03.2020. На ст. Дзержинский температура воды оказалась выше и варьировала от 3.7 до 18°С, составляя в среднем 9.4°С. Ледяной покров на ст. Дзержинский не отмечался. В водах ст. Тушино содержание ионов аммония не превышало 0.05 мг/л. Среднее значение этого параметра в водах ст. Дзержинский составило 0.62 мг/л. Содержание нитратов на ст. Тушино было невысоким – среднее значение – 4.74 мг/л (варьирование от 3.04 до 6.86 мг/л). В водах ст. Дзержинский оно было в 3.5 раза выше – среднее значение 16.69 мг/л (варьирование от 12.73 мг/л до 25.40 мг/л). Содержание фосфатов на ст. Тушино варьировало от 0.05 до 0.44 мг/л, составляя в среднем 0.26 мг/л, в водах ст. Дзержинский размах варьирования этого параметра – от 0.08 до 0.90 мг/л, при среднем значении 0.45 мг/л.

Содержание хлорофилла *a* на ст. Тушино варьировало от 0.71 мкг/л – в конце октября до максимальных значений 18.78 мкг/л – в марте (среднее значение 4.36 ± 5.7мкг/л). Резкое возрастание значений этого параметра (до 13.30 мкг/л) наблюдалось в первой декаде февраля 2020 г. В водах ст. Дзержинский содержание хлорофилла *a* варьировало от минимальных значений 0.46 мкг/л – в конце декабря до максимальных значений

Таблица 1. Результаты пошагового множественного регрессионного анализа влияния факторов среды на численность вириопланктона

Effect	Coefficient	Std Error	Std Coef (Beta)	Tolerance	Student' t	P(2 Tail)
CONSTANT	–0.039	0.117	0.000	.	–0.330	0.746
NH_4	**0.892**	0.259	**1.016**	0.216	3.444	0.004
NO_2	–0.481	0.248	–0.548	0.236	–1.941	0.073
PO_4	**0.363**	0.132	**0.414**	0.829	2.749	0.016

5.10 мкг/л – в сентябре 2019 г. Возрастание значений этого параметра (до 2.63 мкг/л) наблюдалось в марте 2020 г., т.е. позже на месяц, чем на ст. Тушино. Среднее значение содержания хлорофилла *a* в водах ст. Дзержинский составило 1.7 ± 5.7 мкг/л, что было почти в три раза меньше, чем на ст. Тушино.

Сезонная динамика численности бактериопланктона

Численность бактериопланктона в водах варьировала от 0.56 до 3.04 × 10^6 кл./мл, при среднем значении 1.37 ± 0.7 × 10^6 кл./мл. Максимальные значения этого параметра (3.04 × 10^6 кл./мл) были обнаружены 19.09.2019, а минимальные (0.56 × 10^6 кл./мл) – 12.11.2019 (рис. 2). ЧБ на ст. Дзержинский варьировала от 1.16 до 3.62 × × 10^6 кл./мл, при среднем значении 2.01 ± 0.7 × × 10^6 кл./мл. В среднем ЧБ в водах более загрязненной ст. Дзержинский оказалась в 2 раза выше, чем в водах ст. Тушино, однако варьировал этот параметр в меньшей степени, чем на ст. Тушино – различия колебаний составили 3.1 и 5.4 соответственно.

Сезонная динамика численности вирусных частиц

В поверхностных водах реки на ст. Тушино численность вирионов значительно варьировала от минимальных значений – 61.01 × 10^6 частиц/мл (12.12.2019) до максимальных – 186.85 × × 10^6 частиц/мл (12.11.2019), при среднем значении 129.0 ± 39.6 × 10^6 (рис. 3). С сентября (19.09.2019) и до начала ноября (12.11.2019) ЧВ, варьируя, возрастала, затем наблюдалось ее снижение до минимума (61.01 × 10^6 частиц/мл) в первой декаде декабря. С конца декабря ЧВ вновь увеличивалась до 179.13 × 10^6 частиц/мл в феврале. В марте она вновь несколько снизилась до 145.86 × 10^6 частиц/мл (рис. 3).

ЧВ на более загрязненной ст. Дзержинский оказалась значительно выше, чем на ст. Тушино, значения этого параметра варьировали от минимальных 167.79 до максимальных значений – 397.39 × 10^6 частиц/мл, составляя в среднем для станции 235.6 ± 71.5 × 10^6 частиц/мл. В сентябре ЧВ в водах ст. Дзержинский была очень высокой (337.5 × 10^6 частиц/мл), затем до конца октября значения этого параметра последовательно снижались до 167.79 × 10^6 частиц/мл. В начале ноября вновь наблюдалось резкое возрастание ЧВ до 280.28 × 10^6 частиц/мл, затем ее значения снизились до 171.60 × 10^6 частиц/мл (27.11.2019), после этого численность вириопланктона в водах ст. Дзержинский последовательно возрастала до своего максимального значения – 397.39 × 10^6 частиц/мл (11.02.2020). Сезонная динамика численности вирусных частиц в поверхностных водах двух станций имела существенные различия. В начале осени и за кратковременный период в начале декабря (12.12.2019) наблюдались противофазы динамики этого параметра (рис. 3). В остальные периоды наблюдалась синхронная динамика численности вириопланктона, но при этом на ст. Дзержинской численность вирусов в течение всего периода исследований была выше примерно в 2–4 раза, чем на ст. Тушино. Численность вириопланктона, установленная нами для прибрежных вод р. Москвы, варьировала в пределах величин, обычно регистрируемых для мезо- и эвтрофных рек в средней полосе Европы (10–390 млн ч./мл) [2, 6].

Численность вирионов в прибрежных водах реки значительно превосходила численность бактериопланктона – соотношение вирус/бактерий варьировало от 25 до 200, составляя в среднем 110. Согласно результатам современных исследований, это соотношение, определенное для разных водоемов, варьирует в широких пределах от 0.4 до более 100. Наиболее высокие значения этого параметра отмечаются в эвтрофных прибрежных зонах водоемов в холодный период года [5]. Предполагают, что в летний период повышенная температура воды способствует возрастанию скорости ферментативных реакций в клетках бактериопланктона, что ведет к значительному увеличению его численности и тем самым к снижению вирусной нагрузки. В то время как в холодноводный период наблюдаются явления противоположного

характера [5]. По-видимому, полученные нами высокие значения соотношения вирус/бактерий объясняются тем, что исследования проводились именно в осенне-зимний период в таком специфическом экотопе реки, как рипаль.

Между численностью вирио- и бактериопланктона в водах ст. Дзержинский наблюдалась уверенная положительная связь ($R = 0.6, p < 0.01$). При этом значимых корреляций между ЧВ и содержанием хлорофилла *a* нами не было установлено. В тех случаях, когда обнаруживаются значимые корреляции между ЧВ и содержанием хлорофилла *a*, многие авторы предполагают преобладание в популяции вириопланктона фитовирусов, которые инфицируют эукариотный фитопланктон [1, 4]. В нашем же случае можно предполагать доминирование в популяции речного вириопланктона вирусов-бактериофагов. Значимые положительные корреляции также были установлены между численностью вирусов и содержанием в воде аммония, нитратов, фосфатов. При построении регрессионной модели было установлено, что почти три четверти всех различий динамики численности вириопланктона в водах р. Москвы были значимо положительно связаны с содержанием аммония и фосфатов (табл. 1). Подобные результаты докладываются в работах других исследователей [12–14]. Отмечается, что фосфаты могут напрямую стимулировать численность вирусов, усиливая лизогенный ответ природных популяций и способствуя репликации вирусов [12]. Многие загрязняющие вещества, включая неорганический азот, фосфаты, углеводороды, нефть и тяжелые металлы, могут стимулировать высвобождение вирусов из организмов-хозяев [13] и способствовать появлению зимних пиков численности вириопланктона [14].

Таким образом, можно заключить, что значительная доля в составе вириопланктона прибрежных вод р. Москвы была представлена бактериофагами. Высоким значениям ЧВ соответствовали высокие концентрации аммония и фосфора, также с их колебаниями была связана значительная вариабельность ЧВ. Присутствие значительных количеств соединений аммония и фосфора в водах ст. Дзержинский, по-видимому, было связано с влиянием сточных вод. Можно сделать вывод, что повышенная биогенная нагрузка является основным фактором, обусловливающим высокую численность вирио- и бактериопланктона в прибрежных водах р. Москвы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность профессору, д.б.н. А.И. Азовскому за помощь в статистической обработке материалов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”, а также госзадания 0128-2021-0009 и ЦИТИС АААА-А16-116021660054-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jacquet S., Miki T., Noble R., Peduzzi P., Wilhelm St.* Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial ocenography and limnology // Advances in Oceanography and Limnology. 2010. V. 1. № 1. P. 97–141.
2. *Peduzzi P.* Virus ecology of fluvial systems: a black spot on the map? // Biological reviews. 2016. V. 91. P. 937–949.
3. *Weinbauer M.G.* Ecology of prokaryotic viruses // FEMS Microbiol. Rev. 2004. V. 28. P. 127–181.
4. *Wommack K.E., Colwell R.R.* Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems // Microb. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 1. P. 69–114.
5. *Cabral A.S., Lessa M.M., Junger P.C., Thompson F.L. Paranhos R.* Virioplankton dynamics are related to eutrophication levels in a tropical urbanized bay // PLOS one. 2017.
6. *Копылов А.И., Иевлева Т.В., Романенко А.В.* Сезонные и межгодовые изменения численности вириопланктона в реках, протекающих через промышленный город (г. Череповец, Верхняя Волга) // Биология внутренних вод. 2014. № 4. С. 50–53.
7. *Noble R.T., Fuhrman J.A.* Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria // Aquatic Microbial Ecology. 1998. V. 14. № 2. P. 113–118.
8. *Porter K.G., Feig Y.S.* The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora // Limnol Oceanogr. 1980. V. 25. P. 943–948.
9. *Holm-Hansen O., Riemann B.* Chlorophyll a determination: improvements in methodology // Oikos. 1978. С. 438–447.
10. *Маторин Д.Н., Рубин А.Б.* Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей //М. – Ижевск: ИКИ-РХД. 2012. С. 256.
11. *Grashoff K., Kremling K., Ehrhard M.* (1999) Methods of Seawater Analysis. Wiley-VCH, Weinheim-NewYork-Chichester-Brisbane-Singapore-Toronto. P. 420.
12. *Williamson S.J., Houchin L.A., Mcdaniel L., Paul J.H.* Seasonal Variation in Lysogeny as Depicted by Prophage Induction in Tampa Bay Seasonal Variation in Lysogeny as Depicted by Prophage Induction in Tampa Bay Florida. Appl Environ Microbiol. 2002. V. 68.
13. *Danovaro R., Armeni M., Corinaldesi C., Mei M.L.* Viruses and marine pollution. Mar Pollut Bull. 2003. V. 46. P. 301–304.

VIRIO- AND BACTERIOPLANKTON OF THE COASTAL WATER OF THE MOSCOW RIVER

I. V. Mosharova[b,#], V. V. Ilinskiy[a], I. A. Kozlova[a], A. Y. Akylova[a], K. P. Hazanova[a], and S. A. Mosharov[b]

[a] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation*

[b] *Shirshov Institute of Oceanology RAS, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: ivmpost@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS M.V. Flint

For the first time, the dynamics of virioplankton abundance (VA) in the coastal waters of the Moskva River (r. Moskva) in the autumn-winter period at stations differing in the level of anthropogenic impact was studied. VA in waters of more polluted st. Dzerzhinsky (the average value is $235.6 \pm 71.5 \times 10^{-6}$ ml, varying from 167.79 to 397.39×10^{-6} ml) was higher than in the waters of less polluted st. Tushino (mean value $129.0 \pm 39.6 \times 10^{-6}$ ml, varying from 61.01 to 186.85×10^{-6} ml) throughout the study. Between the abundance of virio- and bacterioplankton in the waters of st. Dzerzhinsky, a positive relationship was observed ($R = 0.6$, $p < 0.01$). We assume that a significant proportion of the virioplankton of the coastal waters of the r. Moscow is represented by bacteriophages. Three quarters of the differences in the VA dynamics were significantly positively associated with the content of ammonium and phosphates in the waters at st. Dzerzhinsky. Apparently, the increase in the nutrient load is the main factor responsible for the high VA in the waters of the r. Moskva in the autumn-winter period.

Keywords: virioplankton, bacterioplankton, bacteriophage, Moscow river, anthropogenic pollution

EDN: UFPGXG
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 127–132

УДК [57.023+57.016.2]:57.042:57.054

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОВОРОТНОЙ АКТИВНОСТИ УЧАСТКОВ СТВОЛА ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© 2022 г. С. А. Шавнин[1,*], Д. Ю. Голиков[1], А. А. Монтиле[1,]**

Представлено академиком РАН В.Н. Большаковым
Поступило 10.11.2021 г.
После доработки 27.11.2021 г.
Принято к публикации 27.11.2021 г.

С целью углубления представлений о природе явления закручивания стволов деревьев и его роли в процессах роста и морфогенеза, в течение двух лет исследовали сезонные динамики и взаимосвязи характеристик углов поворота участков внешних слоев заболони у стволов деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в естественном насаждении. Повороты существуют у всех деревьев в течение всего вегетационного периода. Их характеристики не зависят от экспозиции и отличаются у разных участков ствола. Величины углов и направления поворотов смежных участков ствола положительно коррелируют. Доминируют направления поворота против часовой стрелки, в результате чего суммарный угол поворота может увеличиваться с течением времени. Направления и величины сил, вызывающих повороты внешних участков заболони ствола дерева, объясняются, по-видимому, градиентами механических напряжений, возникающих между соседними частями ксилемы в результате неоднородности их увлажнения.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, сезонные изменения, рост и морфогенез древесных растений, закручивание ствола дерева

DOI: 10.31857/S2686738922020196

У большого числа видов древесных растений, как в течение суток, так и более длительного времени, наблюдаются изменения диаметра ствола [1, 2]. Этот эффект связан с процессами радиального роста и набухания-сжатия тканей, сопровождающими вертикальный транспорт воды, минеральных веществ и ассимилятов по ксилеме [1] и флоэме [3, 4]. Следует отметить, что восходящие потоки распределены по ксилеме в сечении ствола неравномерно [5, 6]. Например, у деревьев сосны обыкновенной наблюдается их спиральное движение [7]. Оно объясняется упорядоченным в пространстве расположением ветвей, задающим в ходе транспирации формирование в стволе градиентов водного потенциала – основного фактора, определяющего распределение влаги в растениях [8–10]. При этом изменение оводненности разных участков тканей приводит к их набуханию-сжатию и образованию соответствующих механических напряжений в древесине [11]. В связи с неравномерным распределением в объеме ствола участков с различной оводненностью [12], градиенты действующих сил не полностью совпадают с его вертикальной осью симметрии и могут приводить к тангенциальным смещениям в многослойной структуре сечения ствола [13].

В ходе исследований динамических процессов, участвующих в регуляции роста и морфогенеза дерева, ранее было описано явление поворотов ствола у деревьев сосны (*Pinus sylvestris* L.) и ели (*Picea obovata* Ldb.) и предложена качественная модель связи поворота ствола с процессами камбиального роста [14], объясняющая закономерный характер явления и образование косослоя древесины и закрученности стволов деревьев. Однако в модели отсутствует указание на природу сил, определяющих направление, углы и длительность формирования косослоя.

В связи с необходимостью выяснения причин наблюдаемого явления, цели настоящей работы включали: 1) определить величины и направления поворота ствола (участков внешних слоев заболони) в течение вегетационного периода; 2) оценить характер и степень взаимосвязи этих характеристик поворотной активности у разных

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический сад Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия*
**e-mail: sash@botgard.uran.ru*
***e-mail: org17@mail.ru*

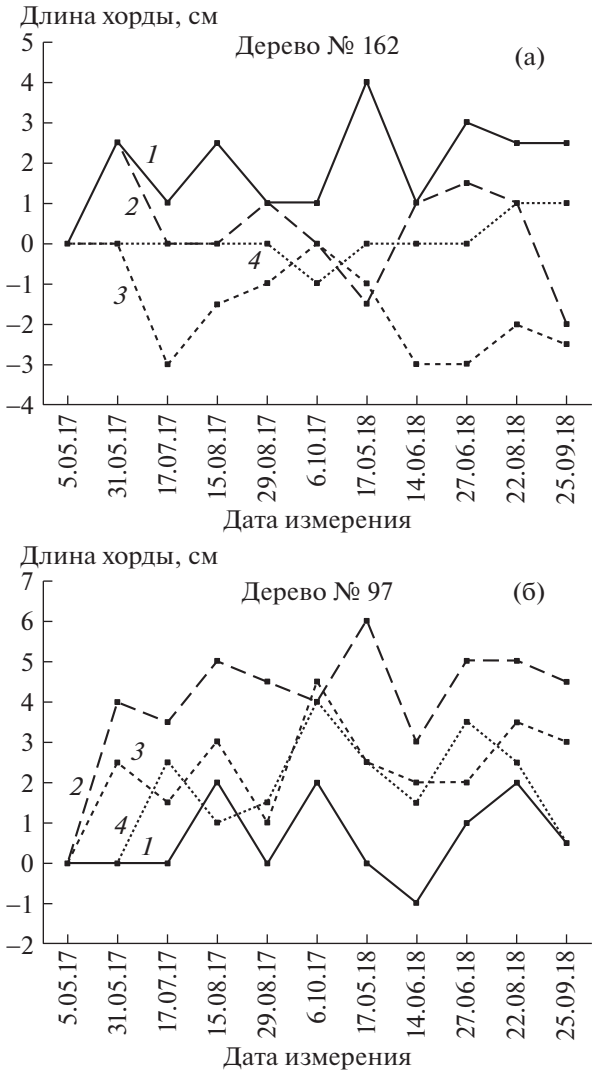


Рис. 1. Сезонные динамики (траектории) величин углов поворота (длин хорд окружностей, описываемых рычагом измерительного устройства) участков стволов разных экспозиций деревьев № 162 (а) и № 97 (б) в 2017–2018 гг. 1–4: Ю-З, С-З, С-В, Ю-В экспозиции соответственно; положительные изменения соответствуют повороту против часовой стрелки, отрицательные – по часовой стрелке.

сторон ствола. Для достижения целей были проведены: а) исследования сезонной динамики поворотной активности стволов деревьев сосны обыкновенной, произрастающих в насаждении естественного происхождения; б) анализ закономерностей сезонных изменений направлений и величин углов поворота участков стволов разной экспозиции; в) разработка дополнений к предложенной ранее качественной модели закручивания ствола дерева.

Объектом исследований являлись деревья сосны обыкновенной, произрастающие на территории дендрария Ботанического сада УрО РАН (г. Екатеринбург, РФ), относящейся к южно-таежной подзоне Среднеуральской низкогорной провинции Уральской горнолесной области [15]. При обследовании древостоев использовали метод пробных площадей (ПП). На ПП, заложенной в соответствии с ОСТ 56-69-83, определяли базовые таксационные показатели. Насаждения имеют естественное происхождение, тип леса – С.ртр., состав – 10С, ед.Б, VII класс возраста, III класс бонитета, полнота 0.8, средний диаметр 39.7 см, средняя высота 25.4 м. Общее количество деревьев на ПП составляет 481, площадь ПП 2.1 га.

Для проведения исследований были отобраны 36 средних по диаметрам и высотам деревьев. Величины и направления поворота определяли у участков внешних слоев заболони стволов отдельных деревьев с четырех разных экспозиций (Ю-В, Ю-З, С-В, С-З) на протяжении 2017–2018 гг. Угол поворота определяли 5–6 раз за период “весна – осень” по величине хорды окружности, описываемой рычагом измерительного устройства в горизонтальной плоскости (Шавнин и др., 2018). Общее количество определений в каждый момент времени составляло 144. С целью выявления наиболее общих закономерностей анализировали величины суммарных углов поворотов стволов за отдельные периоды измерений, которые определяли усреднением всех измерений (независимо от номера дерева и экспозиции) в данный момент времени с учетом знака (направления поворота), либо по модулю.

Для анализа рядов сезонной динамики поворотов ствола применяли стандартные методы многомерной статистики. Расчеты проводились в программах Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007), Excel (Microsoft, 2003) и “Классан” [16].

Ввиду большого объема данных, результаты измерений углов поворотов стволов у отдельных деревьев рассмотрены на примере двух типичных экземпляров. В 2017 г. у дерева № 162 (рис. 1а) вращение в мае происходило в сторону “+” (против часовой стрелки) у Ю-З и С-З экспозиций и отсутствовало – у Ю-В и С-В. В период 05.05.2017 г.–17.07.2017 г. направление поворота изменилось на противоположное у трех экспозиций и отсутствовало – у Ю-В. В дальнейшем углы поворота у разных экспозиций изменялись по направлению и величине также не согласованно или частично согласованно на протяжении всех двух лет исследований. Следует отметить, что у данного дерева на протяжении двух лет наблюдаются как “+”, так и “–” – повороты. У дерева № 97 (рис. 1б) у экспозиций С-З, С-В и Ю-В доминируют “+” – повороты, а у Ю-З доминирование не наблюдается.

Проведенный для всех деревьев корреляционный анализ сезонных динамик углов поворота смежных сторон ствола между собой показал, что их взаимосвязи достоверны только в половине

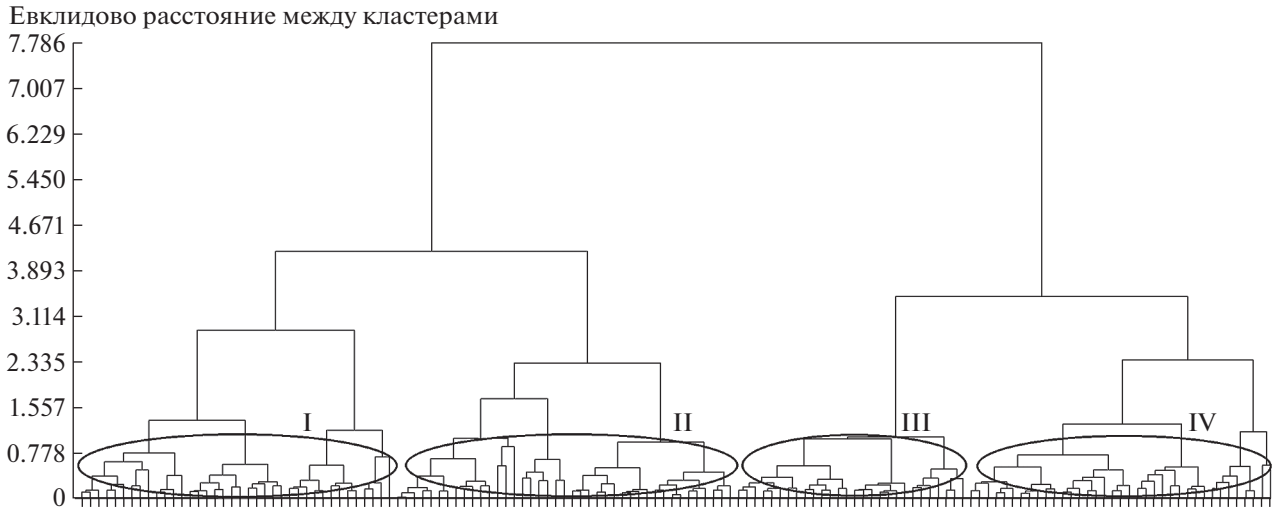


Рис. 2. Дендрограмма сходства 144 траекторий поворотов участков стволов четырех экспозиций 36 деревьев в 2017 г. I–IV – выделенные типы траекторий.

случаев. Величины коэффициентов корреляции варьируют в широком диапазоне (0.125–0.918, $p < 0.1$) и есть единичные случаи нулевых и отрицательных корреляций. У несмежных экспозиций ствола величины углов поворота, как правило, не взаимосвязаны. Величины и направления поворотов каждой стороны дерева изменяются в течение всего периода весна – осень.

Ввиду отсутствия наблюдаемой у большинства деревьев взаимосвязи между характеристиками вращения разных сторон ствола, годовые сезонные динамики по каждой экспозиции (траектории) кластеризовали независимо от экспозиции у всех деревьев с помощью евклидовой метрики (метод Уорда). Анализ данных 2017 г. (рис. 2) позволяет установить четыре типа динамик, которые наблюдаются у разных деревьев с различной частотой. У одного дерева встречается 4 типа траекторий, у 21 дерева – 3 типа, у 12–2 типа и у 2–1 тип. Аналогичный анализ, проведенный для данных 2018 г., подтвердил выявленные закономерности, свидетельствующие о неслучайном характере участвующих в формировании поворота процессов.

Далее была рассмотрена сезонная динамика суммарного угла поворота ствола в течение двух лет (рис. 3), расчет которой проводили с учетом направления вращения для выборки, включающей все деревья. Статистически значимое вращение стволов наблюдается уже в мае в 2017 г. В период 31.05.2017 г. – 15.06.2017 г. происходит увеличение поворотной активности с последующей ее относительной стабилизацией. В 2018 г. активация вращения произошла позже (во второй половине июня), а стабилизация – в сентябре. Следует отметить, что в течение апреля – начале мая 2018 г. [17] суммы средних за декаду эффективных температур были на 20–30°С ниже, чем в 2017 г.

Суммарный угол поворота ствола, рассчитанный без учета направлений величин его отдельных составляющих (рис. 3), возрастает уже в мае 2017 г. В дальнейшем его величина стабилизируется, дополнительно увеличивается в середине августа, после чего вращение стволов приоста-

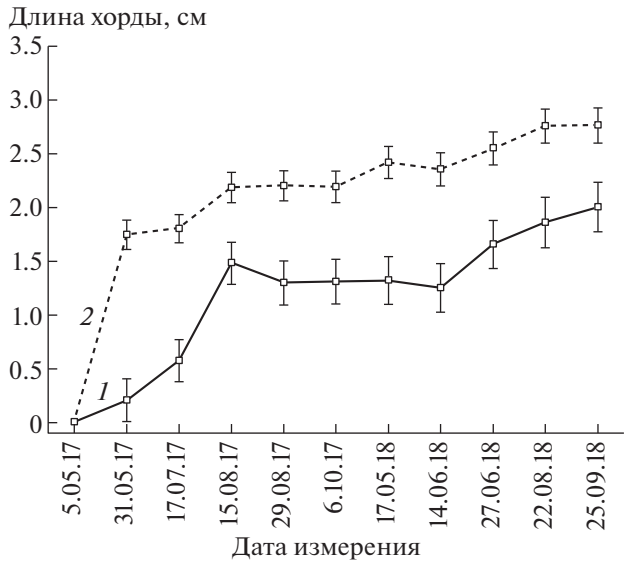


Рис. 3. Сезонные динамики величин средних суммарных углов поворота участков стволов четырех экспозиций 36 деревьев в 2017–2018 гг. Приведены длины хорд окружностей, описываемых рычагом измерительного устройства при повороте; *1*, *2* – величины рассчитаны с учетом и без учета направления поворота соответственно; указаны стандартные ошибки среднего.

Таблица 1. Результаты регрессионного анализа величин углов поворотов участков ствола (36 деревьев, 4 экспозиции) за два смежных по времени срока. Приведены параметры линейных регрессий и их коэффициенты детерминации; x, y – величины углов поворота в предшествующий и последующий моменты времени измерений соответственно

Даты измерений поворотов		Параметры регрессии	
		R^2	Уравнение
31.05.2017	17.07.2017	0.350	y = 0.579x + 0.448
17.07.2017	15.08.2017	0.712	y = 0.856x + 0.991
15.08.2017	29.08.2017	0.648	y = 0.842x + 0.049
29.08.2017	06.10.2017	0.670	y = 0.867x + 0.121
17.05.2018	14.06.2018	0.576	y = 0.770x + 0.228
14.06.2018	27.06.2018	0.624	y = 0.764x + 0.734
27.06.2018	22.08.2018	0.690	y = 0.877x + 0.388
22.08.2018	25.09.2018	0.660	y = 0.799x + 0.518

навливается. В мае 2018 г. наблюдалось небольшое, а в августе – сентябре – достоверное увеличение суммарного угла поворота. Отличие двух описанных динамик в мае 2017 г. объясняется значительным количеством обратных по направлению поворотов в этот период. Проведенный двухэтапный анализ позволяет заключить, что поворотная активность деревьев сосны начинается в мае – июне, что соответствует периоду активного камбиального и апикального роста, и сохраняется до августа – сентября.

Регрессионный анализ величин углов поворота всех изученных деревьев в пределах одной экспозиции (табл. 1) показал, что в течение 2017–2018 гг. существуют положительные парные корреляции между значениями, полученными в интервале времени до двух месяцев. Эта закономерность указывает на то, что в пределах одной экспозиции вызывающие вращение силы могут изменяться по модулю, однако направление их результирующей сохраняется. Согласно данным 2017 г., в период измерений май – июль степень взаимосвязи меньше (коэффициент детерминации $R^2 = 0.350$), чем в последующие три ($R^2 = 0.712$, 0.648 и 0.670 соответственно). Более слабая корреляция углов поворота в этот период свидетельствует о наличии весной и в начале лета дополнительных факторов, снижающих упорядоченность во времени локализаций и величин возникающих в древесине механических напряжений. Одним из них, по-видимому, является отличие в 2017 г. сроков активации физиологических процессов у разных деревьев в древостое. По сравнению с 2017 г., в 2018 г. корреляция углов поворота за смежные по времени периоды в мае – июне выше, и сохраняется в течение всего вегетационного сезона ($R^2 = 0.576$–0.690).

Результаты анализа полученных данных указывают на то, что повороты внешних слоев заболони вызывают силы, возникающие в результате действия внутренних механических напряжений в древесине ствола. Последние являются, по-видимому, следствием разной оводненности смежных участков заболони, обусловленной неравномерным распределением в объеме ствола вертикальных и/или спиральных транспортных потоков воды. На существование напряжений, связанных с неравномерным распределением влаги в поперечном сечении ствола, указывают следующие закономерности и факты. Первое – установлено наличие взаимосвязи между характеристиками поворотов участков ствола смежных экспозиций. Оно связано, по-видимому, с несимметричной относительно центральной оси локализацией восходящих потоков влаги [18]. О пространственной упорядоченности этих потоков свидетельствует явление спирального движения воды в стволе молодых деревьев сосны обыкновенной [7]. Следует отметить, что наличие спиральных структур в древесине установлено у большого числа видов деревьев, включая сосну обыкновенную [19, 20]. Второе – поворотная активность участков ствола наблюдается в течение всего периода вегетации, что указывает на важную роль в ее формировании погодно-климатических факторов. Третье – установлены наличие связи между характеристиками поворотов участков ствола одной экспозиции в течение 1–2 мес и существование в сезонной динамике фактов изменения направления поворота на противоположное. Эти результаты свидетельствуют о том, что механические напряжения в заболони возникают на определенное время и могут изменяться как по величине, так и по направлению.

Таким образом, повороты внешних участков заболони на разных сторонах ствола существуют у всех деревьев сосны обыкновенной в течение всего вегетационного периода. Они возникают в результате смещений внешних слоев заболони, которые вызывают поворот исследуемого участка ствола вокруг вертикальной оси в горизонтальной плоскости в одном из двух тангенциальных направлений.

Величины и направления углов поворота разных участков ствола отличаются и не зависят непосредственно от экспозиции. Величины углов поворотов участков ствола с одинаковой экспозицией максимально коррелируют в течение смежных периодов времени (одного – двух месяцев). Существует взаимосвязь направлений поворотов у участков ствола смежных экспозиций. Доминируют направления поворота против часовой стрелки, в результате чего суммарный угол поворота может увеличиваться с течением времени. При этом на протяжении вегетационного периода наблюдаются изменения как величин уг-

лов, так и направлений поворота отдельных участков ствола. Установлено наличие четырех типов сезонных динамик поворотов участков ствола, указывающее на наличие упорядочивающего поворотную активность фактора.

Направления и величины сил, вызывающих повороты внешних участков заболони ствола дерева, объясняются, по-видимому, механическими напряжениями, возникающими между соседними частями ксилемы в результате неоднородности их увлажнения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.с.-х.н. И.С. Овчинникову за рекомендации на этапе формирования цели и задач исследования, а также разработку использованной в работе методики измерения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования, результаты которых изложены в статье, не связаны с использованием людей и/или животных в качестве объектов исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной программы УрО РАН на 2018–2020 гг. (грант № 18-4-4-10) и в рамках Госзадания Ботанического сада УрО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sevanto S., Vesala T., Perämäki M., et al.* Time lags for xylem and stem diameter variations in Scots pine // Plant, Cell Environ. 2002. V. 25, Iss. 8. P. 1071–1077.
2. *Chan T., Berninger F., Kolari P., et al.* Linking stem growth respiration to the seasonal course of stem growth and GPP of Scots pine // Tree Physiol. 2018. V. 38 (9). P. 1356–1370.
3. *Sevanto S., Nikinmaa E., Riikonen A., et al.* Linking xylem diameter variations with sap flow measurements // Plant Soil. 2008. V. 305, Iss. 1–2. P. 77–90.
4. *Knoblauch M., Peters W. S.* Münch, morphology, microfluidics – our structural problem with the phloem // Plant, Cell Environ. 2010. V. 33 (9). P. 1439–1452.
5. *Matthes U., Kelly P.E., Ryan C.E., et al.* The formation and possible ecological function of stem strips in Thuja occidentalis // Int. J. Plant Sci. 2002. V. 163 (6). P. 949–958.
6. *Nadezdina N.* Integration of water transport pathways in a maple tree: responces of sap flow to branch severing // Ann. For. Sci. 2010. V. 67. P. 107.
7. *Кайбияйнен Л.К., Хари П.* Сбалансированность системы водного транспорта у сосны обыкновенной. I. Пути движения влаги в ксилеме // Лесоведение. 1985. № 5. С. 23–28.
8. *Sevanto S., Hölttä T., Holbrook N.M.* Effects of the hydraulic coupling between xylem and phloem on diurnal phloem diameter variation // Plant, Cell Environ. 2011. V. 34 (4). P. 690–703.
9. *Oberhuber W., Kofler W., Schuster R., et al.* Environmental effects on stem water deficit in co-occurring conifers exposed to soil dryness // Int. J. Biometeorol. 2015. V. 59 (4). P. 417–426.
10. *Venturas M.D., Sperry J.S., Hacke U.G.* Plant xylem hydraulics: What we understand, current research, and future challenges // J. Integr. Plant Biol. 2017. V. 59, Iss. 6. P. 356–389.
11. *Swaef T.D., De Schepper V., Vandegehuchte M.W., et al.* Stem diameter variations as a versatile research tool in ecophysiology // Tree Physiol. 2015. V. 35 (10), Iss. 10. P. 1047–1061.
12. *Pfautsch S., Aspinwall M.J, Drake J.E, et al.* Traits and trade-offs in whole-tree hydraulic architecture along the vertical axis of Eucalyptus grandis // Ann. Bot. 2018. V. 121 (1). P. 129–141.
13. *Zimmermann M.H.* Xylem structure and the ascent of sap. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1983. 146 p.
14. *Шавнин С.А., Овчинников И.С., Голиков Д.Ю., и др.* Явление поворота ствола в процессе роста у древесных растений (на примере *Pinus sylvestris* L. и *Picea obovata* Ldb.) // Сиб. экол. журн. 2018. Т. 25, № 1. С. 89–97.
15. *Колесников Б.П., Зубарева Р.С., Смолоногов Е.П.* Лесорастительные условия и типы лесов Свердловской области: Практическое руководство. Свердловск: ИЭРиЖ, 1973. 176 с.
16. Свид. 2017610856 Российская Федерация. Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ. Программа решения задачи классификации на основе анализа наборов кластерных конфигурация и средств визуальной обработки данных / А.А. Монтиле, А.И. Монтиле, С.А. Шавнин; заявитель и правообладатель ФГБУН Ботанический сад УрО РАН (RU). – Заявка № 2016662912; заявл. 23.11.2016; опубл. 18.01.2017, Реестр программ для ЭВМ. – 1 с.
17. Интернет-ресурс метеорологической информации. 2019. URL: http://www.pogodaiklimat.ru
18. *Cermak J., Kucera J.* Scaling up transpiration data between trees, stands and watersheds // Silva Carelica. 1990. V. 15. P. 101–120.
19. *Harris J.M.* Spiral Grain and Wave Phenomena in Wood Formation. Springer-Verlag, 1989. 214 p.
20. *Richter Ch.* Wood characteristics: description, causes, prevention, impact on use and technological adaptation. Springer International Publishing Switzerland, 2015. 222 p.

SEASONAL DYNAMICS AND REGULARITIES OF SCOTS PINE TREE TRUNK SECTIONS ROTATION ACTIVITY

S. A. Shavnin[a,#], D. Yu. Golikov[a], and A. A. Montile[a,##]

[a] *Institute Botanic Garden, Ural Branch, Russian Academy of Science, Yekaterinburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: sash@botgard.uran.ru*

[##]*e-mail: org17@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS V.N. Bolshakov

Seasonal dynamics and interrelationships of the characteristics of sapwood outer layers rotation in tree trunks of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in natural stands were studied in order to deepen the understanding of the phenomenon of tree trunks twisting and its role in the processes of growth and morphogenesis. During the entire growing season rotations exist in all trees. Characteristics of twisting do not depend on exposure and differs in various parts of the trunk. The angles values and the rotation directions of the adjacent trunk sections are correlated positively. Counterclockwise rotation direction dominate, consequently the total rotation angle might increase over time. The directions and magnitudes of forces that cause rotation activity are apparently explained by the gradients of mechanical stresses arising between adjacent parts of xylem as a result of the humidity inhomogeneity.

Keywords: Scots pine, seasonal changes, growth and morphogenesis of woody plants, twisting of a tree trunk

EDN: FMPQVM
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 133–137

УДК 593.99, 595.122.2

ПЕРВАЯ НАХОДКА ТРЕМАТОД (DIGENEA) В ГЛУБОКОВОДНЫХ КИШЕЧНОДЫШАЩИХ TORQUARATORIDAE (HEMICHORDATA, ENTEROPNEUSTA)

© 2022 г. О. В. Ежова[1,*], К. И. Белолюбская[1], Д. Ю. Крупенко[2], А. И. Лукиных[1], академик РАН В. В. Малахов[1]

Поступило 28.12.2021 г.
После доработки 15.01.2022 г.
Принято к публикации 15.01.2022 г.

Впервые описаны трематоды из кишечнодышащих полухордовых. Метацеркарии были найдены в туловищном, воротниковом и хоботковом целомах, а также в гломерулюсе глубоководной торквараториды *Quatuoralisia malakhovi*. Это первое обнаружение паразитов в гломерулюсе полухордовых. Высказаны предположения относительно систематической принадлежности обнаруженной трематоды.

Ключевые слова: дигенетические сосальщики, *Quatuoralisia malakhovi*, Enteropneusta, Torquaratoridae, Берингово море, гистология, морфология

DOI: 10.31857/S2686738922020081

Новое семейство кишечнодышащих Torquaratoridae, открытое лишь в 2005 г. [1], объединяет виды, обитающие на больших глубинах – от 350 до 4000 м [1–3]. Глубоководные кишечнодышащие из семейства Torquaratoridae значительно отличаются от мелководных представителей класса. Торквараториды обычно ведут эпибентосный образ жизни, медленно ползая по поверхности дна и не зарываясь в норки. Их хоботок короткий и не содержит мощной мускулатуры. Воротниковый отдел, наоборот, как правило, разрастается в стороны, формируя выраженные латеральные губы, которыми животные пользуются для сбора осадка с поверхности грунта [1–3].

Биология кишечнодышащих вообще, а тем более – глубоководных представителей этого класса, изучена слабо. В частности, имеется мало данных о паразитах и комменсалах Enteropneusta. Поражение кишечнодышащих различными эндопаразитами, как многоклеточными, так и одноклеточными, на данный момент описано только для представителей семейства Ptychoderidae. В латеральных крыльях *Ptychodera flava* обитают сравнительно крупные копеподы [4]. Кокцидии на разных стадиях жизненного цикла и другие Apicomplexa обнаружены в туловищном целоме бранхиогенитального и печеночного отделов [5, 6], а также в кишечном эпителии [7–9] *Glossobalanus minutus*.

В литературе зафиксирован случай комменсализма или эктопаразитизма (предположительно, пиявки) на латеральных крыльях кишечнодышащего из семейства Torquaratoridae – *Allapasus isidis* [2]. Для другой торквараториды – *Torquarator bullocki* – отмечены комменсальные бескишечные турбеллярии в глотке и копеподы из отряда Harpacticoida в постпеченочном отделе кишечника, которые также могут быть паразитами или комменсалами [1]. Никаких сведений об обитании в кишечнодышащих таких распространенных паразитов как трематоды, до сих пор не было.

Quatuoralisia malakhovi найдена в северо-западной части Тихого океана в Беринговом море, на глубинах 1370–2470 м [3]. Материалом для работы послужили экземпляры, собранные на склонах Массива Вулканологов в 2016 и 2018 г. в ходе рейсов НИС “Академик М.А. Лаврентьев” (табл. 1), с применением ТПА “Команч 18”. Метацеркарии тре-

[1]*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия*
[2]*Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия*
**e-mail: olga.ejova@gmail.com*

Таблица 1. Данные сборов изученных экземпляров кишечнодышащего *Quatuoralisia malakhovi*

Рейс	Станция	Дата сбора	Координаты	Глубина, м	Кол-во изученных экземпляров
75	LV 75-17	27.06.2016	55.4609 N 167.2688 E	2289	3
82	LV 82-9	18.06.2018	55.3451–55.3466 N 167.2750–167.2752 E	1957–1933	4

Таблица 2. Положение найденных метацеркарий в теле *Quatuoralisia malakhovi*

Коллекционный номер экземпляра *Q. malakhovi*	Орган	Количество найденных метацеркарий
2019-QM-04	Туловищный целом	1
2020-QM-05	Туловищный целом	2
	Хоботковый целом	7
	Гломерулюс	11
2020-QM-06	Туловищный целом	1
	Воротниковый целом	5

матод были обнаружены на гистологических срезах экземпляров *Q. malakhovi*, собранных в 2018 г. Материал для гистологического исследования был зафиксирован в 8%-ном формалине на морской воде.

Отмывка от фиксатора и дегидратация материала проводились по стандартной методике в спиртах восходящей концентрации. Подготовленные для гистологического исследования фрагменты были залиты в парапластовые блоки и разложены с помощью микротома “Leica RM 2125” на серии гистологических срезов толщиной 10 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином Караччи и спиртовым раствором эозина. Съемка срезов производилась с помощью микроскопа “Микмед-6” (LOMO, Санкт-Петербург, Россия, 2018) с цифровой камерой “МС-12”. Все гистологические работы осуществлены в студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных (www.evolmorphan.ru) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Коллекции серий гистологических срезов хранятся там же; коллекционные номера приведены в табл. 2.

Нами было изучено 7 экземпляров *Q. malakhovi* (табл. 1). Трематоды были обнаружены в трех экземплярах *Q. malakhovi*. Максимальное число особей трематод (метацеркарий), найденных в одном экземпляре хозяина, составляет 20. Отдельные метацеркарии встречаются у этого экземпляра в целоме бранхиогенитального отдела туловища, в хоботковом целоме, однако наибольшее число паразитов обнаружено в гломерулюсе *Q. malakhovi* – 11 особей (рис. 1а; табл. 2). На гистологических срезах других изучаемых экземпляров *Q. malakhovi* найдены метацеркарии в целоме бранхиогенитального отдела туловища (рис. 1в) и в воротниковом целоме (табл. 2).

Размеры метацеркарий составляют приблизительно 100–110 мкм в длину и около 90 мкм в поперечном диаметре (рис. 1а–1в). Каждая метацеркария снабжена двумя присосками – ротовой и брюшной (рис. 1а, 1в). Ротовая присоска ведет в глотку, за которой следует короткий пищевод (рис. 1а). Дорсальнее брюшной присоски лежит плотное скопление темных клеток – предположительно половой зачаток (рис. 1а). В передней трети метацеркарии расположено несколько пар одноклеточных желез (рис. 1а, 1б). Их протоки тянутся близ дорсальной стороны тела к его переднему концу (рис. 1б). В задней половине тела метацеркарии находится крупная светлая округлая полость – мочевой пузырек (рис. 1а). Тегумент метацеркарий тонкий, его толщина составляет около 3 мкм. В тегументе видны шипики (рис. 1г).

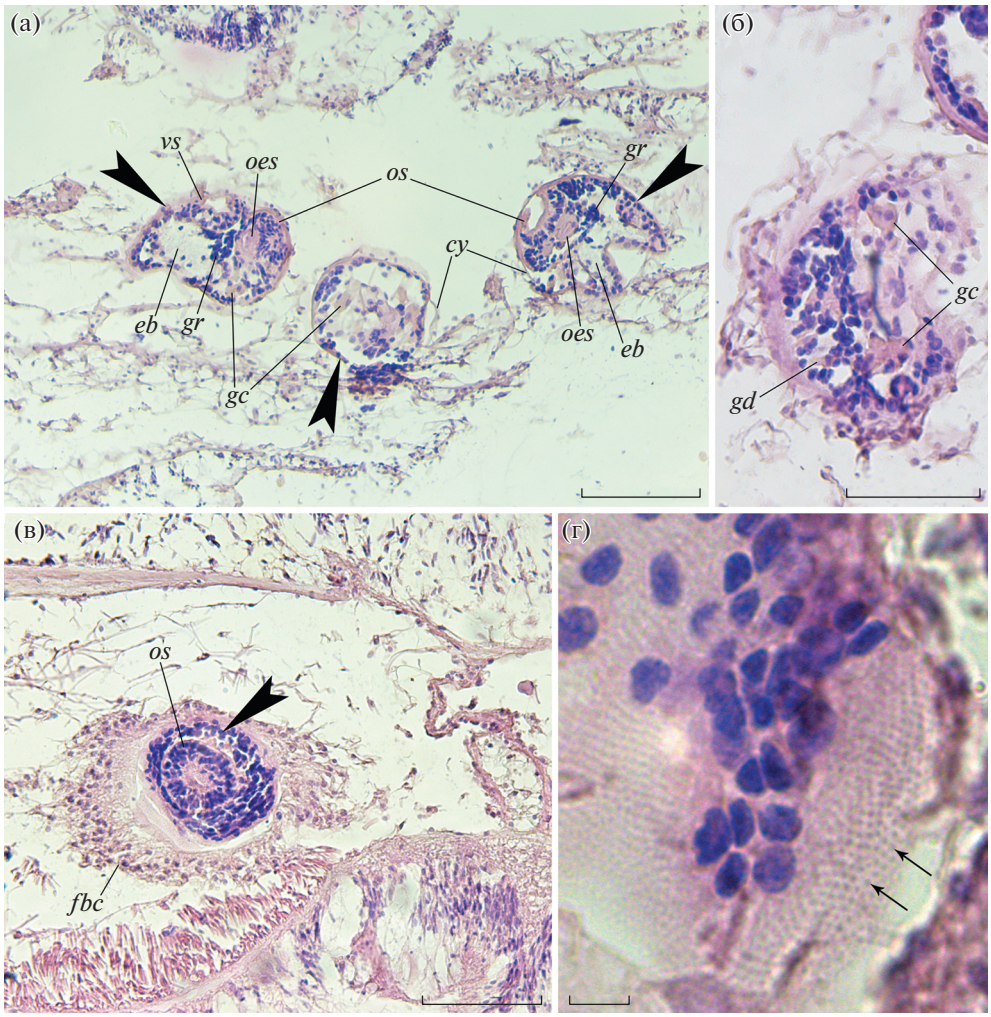


Рис. 1. Расположение метацеркарий (указаны наконечниками стрелок) в различных участках тела *Quatuoralisia malakhovi*: (а, б) в гломерулюсе, (в) в туловищном целоме; а также строение вооруженного шипиками тегумента исследуемых метацеркарий на тангенциальном срезе (г). Шипики в тегументе указаны стрелками. *cy* – оболочка цисты; *eb* – мочевой пузырек; *fbc* – соединительнотканная капсула из клеток хозяина; *gc* – одноклеточные железы; *gd* – протоки одноклеточных желез; *gr* – половой зачаток; *oes* – пищевод; *os* – ротовая присоска; *vs* – брюшная присоска. Масштаб (а, в) – 100 мкм, (б) – 40 мкм, (г) – 5 мкм.

Метацеркарии окружены тонкостенной цистой (рис. 1а), вокруг которой хозяин формирует капсулу из чешуевидных соединительнотканных клеток (фибробластов). В одном случае толщина оболочки капсулы, состоящей из нескольких слоев соединительнотканных клеток, достигала 100 мкм (рис. 1в).

Как известно, трематоды во взрослом состоянии паразитируют обычно у позвоночных животных. В данном случае окончательным хозяином могут быть глубоководные рыбы. В рыбах, обитающих на глубине около 2000 м и ниже, в настоящее время обнаружены представители всего восьми семейств Digenea [10, 11]: Derogenidae, Fellodistomidae, Gonocercidae, Hemiuridae, Lecithasteridae, Lepidapedidae, Opecoelidae и Zoogonidae. Представители еще нескольких семейств (Bivesiculidae, Hirudinellidae, Ptychogonimidae, Sclerodistomidae и Syncoeliidae) описаны из глубоководных рыб, но без точных батиметрических данных. У Fellodistomidae, Gonocercidae, Hemiuridae, Lecithasteridae, Opecoelidae, Ptychogonimidae, Sclerodistomidae и Syncoeliidae в тегументе отсутствуют шипики [12, 13]. У единственного глубоководного представителя Gorgoderidae (*Degeneria halosauri*) Y-образный мочевой пузырек [14], а у Bivesiculidae – V-образный [12], а не округлый, как у обнаруженных нами метацеркарий. Кроме того, у Bivesiculidae отсутствуют ротовая и брюшная присоски. Мочевой пузырек у марит Lepidapedidae трубковидный, однако у их церкарий и метацеркарий он может быть округлым [13, 15]. Также округлым мочевым пузырьком обладают Zoogonidae [14]. Представители и Lepidapedidae, и Zoogonidae ха-

рактеризуются тонкими острыми шипиками в тегументе. Таким образом, возможно, обнаруженные нами метацеркарии относятся к семействам Zoogonidae или Lepidapedidae, хотя окончательную ясность в этом вопросе поможет внести молекулярное исследование.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность “Национальному научному центру морской биологии” ДВО РАН за организацию и проведение 75 и 82 рейсов НИС “Академик М.А. Лаврентьев”, а также ФАНО России за финансирование этих экспедиций. Особая благодарность пилотам и техникам, обеспечившим в рейсах работы с применением ТПА “Команч 18”. Авторы глубоко признательны сотрудникам Института океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук Е.М. Крыловой, С.В. Галкину и А.В. Гебрукуза предоставление материала и ценные советы при подготовке рукописи.

Все гистологические работы осуществлены в студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных (www.evolmorphan.ru) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 18-74-10025. Участие В.В. Малахова поддержано грантом РФФИ № 20-04-00909-а.

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова № 121032300121-0.

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. *Holland N.D., Clague D.A., Gordon D.P., et al.* ‘Lophenteropneust’ hypothesis refuted by collection and photos of new deep-sea hemichordates // Nature. 2005. V. 434. P. 374–376.

2. *Priede I.G., Osborn K.J., Gebruk A.V., et al.* Observations on torquaratorid acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) from the North Atlantic with descriptions of a new genus and three new species // Invert. Biol. 2012. V. 131. № 3. P. 244–257.

3. *Ezhova O.V., Lukinykh A.I., Galkin S.V., et al.* Deep-sea acorn worms (Enteropneusta) from the Bering Sea with the description of a new genus and a new species of Torquaratoridae dominating soft-bottom communities // Deep-Sea Research II. 2022. V. 195. 105014.

4. *Tung C.H., Cheng Y.R., Lin C.Y., et al.* A new copepod with transformed body plan and unique phylogenetic position parasitic in the acorn worm *Ptychodera flava* // Biol. Bull. 2014. V. 226. № 1. P. 69–80.

5. *Benito J., Fernández I.* The ultrastructural identity of *Protoentospora ptychoderae* Sun, 1910 (Apicomplexa, Coccidia), a parasite of the body cavity of the enteropneust *Glossobalanus minutus* (Kowalewsky, 1866): Growing trophozoites // Eur. J. Protistol. 1989. V. 25. № 2. P. 168–171.

6. *Benito J., Fernández I.* Ultrastructural observations on merogony of *Protoentospora ptychoderae* Sun, 1910 (Apicomplexa, Coccidia) from the enteropneust *Glossobalanus minutus* (Kowalewsky, 1866) // Eur. J. Protistol. 1990. V. 25. № 4. P. 338–344.

7. *Fernandez I., Benito J., Pardos F.* Ultrastructure of the oocyst wall formation in *Eimeria? beauchampi* Leger and Duboscq, 1917, a coccidian parasite of *Glossobalanus minutus* (Kow.) (Enteropneusta, Hemichordata) // Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1988. V. 63. № 4. P. 253–262.

8. *Fernández I., Arroyo N.-L., Pardos F., et al.* Penetration into the gut cells of an enteropneust by the flagellate *Acrocoelus glossobalani* Fernández et al., 1999 // Eur. J. Protistol. 1999. V. 35. № 3. P. 255–263.

9. *Fernandez I., Pardos E., Benito J., et al. Acrocoelus glossobalani* gen. nov. et sp. nov., a protistan flagellate from the gut of the enteropneust *Glossobalanus minutus* // Eur. J. Protistol. 1999. V. 35. № 1. P. 55–65.

10. *Bray R.A.* The bathymetric distribution of the digenean parasites of deep-sea fishes // Folia Parasitologica. 2004. V. 51. P. 268–274.

11. *Bray R.A.* Digenean parasites of deep-sea teleosts: A progress report // Int. J. Parasitol. Parasites and Wildlife. 2020. V. 12. P. 251–264.

12. *Gibson D.I., Jones A., Bray R.A.* Keys to the Trematoda. Wallingford: CABI. 2002. V. 2.

13. *Jones A., Bray R.A., Gibson D.I.* Keys to the Trematoda. Wallingford: CABI. 2005. V. 2. P. 733.

14. *Bray R.A., Gibson D.I., Jones A.* Keys to the Trematoda. Wallingford: CABI. 2008. V. 3.

15. *Køie M.* On the morphology and life-history of *Lepidapedon elongatum* (Lebour, 1908) Nicoll, 1910 (Trematoda, Lepocread iidae) // Ophelia. 1985. V. 24. № 3. P. 135–153.

THE FIRST DISCOVERY OF TREMATODES (DIGENEA) IN DEEP-SEA ACORN WORMS TORQUARATORIDAE (HEMICHORDATA, ENTEROPNEUSTA)

O. V. Ezhova[a,#], K. I. Belolubskaya[a], D. Y. Krupenko[b], A. I. Lukinykh[a], and Academician of the RAS V. V. Malakhov[a]

[a] *Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russian Federation*
[b] *Saint Petersburg State University, Biological Faculty, Saint Petersburg, Russian Federation*
[#] *e-mail: olga.ejova@gmail.com*

Trematodes from enteropneust hemichordates are described for the first time. The metacercariae are found in the trunk coelom, in the collar coelom, in the proboscis coelom, and in the glomerulus of the deep-sea torquaratorid *Quatuoralisia malakhovi*. It is the first find of parasites in the glomerulus of acorn worms. Assumptions about the taxonomic affiliation of the detected trematode are discussed.

Keywords: Digenea, *Quatuoralisia malakhovi*, acorn worms, Torquaratoridae, Bering Sea, histology, morphology

EDN: EJOFWX
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 138–143

УДК 57.021 616-092.9

СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ 6-БРОМОГИПАФОРИНА, ПРИРОДНОГО АГОНИСТА НИКОТИНОВЫХ ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ, УМЕНЬШАЮТ РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕРДЦА В МОДЕЛИ ИШЕМИИ МИОКАРДА У КРЫС

© 2022 г. Э. Р. Шайхутдинова[1], А. Е. Кондрахина[1], И. А. Иванов[2], Д. С. Кудрявцев[2], И. А. Дьяченко[1], А. Н. Мурашев[1], член-корреспондент РАН В. И. Цетлин[2], Ю. Н. Уткин[2,*]

Поступило 10.11.2021 г.
После доработки 25.11.2021 г.
Принято к публикации 25.11.2021 г.

Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что активация никотиновых холинорецепторов (нХР) типа α7 может уменьшать повреждения сердца, возникающие в результате ишемии и последующей реперфузии. Нами проведено исследование двух новых синтетических D-аналогов 6-бромогипафорина, являющихся избирательными агонистами α7 нХР, на модели ишемии миокарда у крыс. Острый инфаркт миокарда у животных вызывали путем окклюзии левой коронарной артерии с ее последующей реперфузией при искусственной вентиляции легких. Обнаружено, что один из аналогов оказался более активным и его введение на первой минуте реперфузии приводило к статистически достоверному снижению размера инфаркта. Этот аналог также предотвращал изменение концентрации ионов калия и натрия в крови, характерное для окклюзионно-реперфузионного повреждения. Полученные данные свидетельствуют о перспективности аналогов гипафорина для разработки препаратов, уменьшающих неблагоприятные последствия инфаркта миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, реперфузионные повреждения, 6-бромогипафорин, синтетические аналоги, никотиновый холинорецептор

DOI: 10.31857/S2686738922020184

Проблема повышения устойчивости сердца к действию ишемии и реперфузии является одной из наиболее важных задач современной кардиологии, патофизиологии, экспериментальной и клинической фармакологии. Следует отметить, что ишемия длительностью более 10–15 мин сопровождается необратимыми изменениями в кардиомиоцитах и, как следствие, их гибелью, даже в случае возобновления нормальной оксигенации. Постишемическое восстановление кровотока после длительной (30–60 мин) ишемии не только не возвращает метаболические процессы на доишемический уровень, но и усугубляет гипоксическое повреждение отдельных кардиомиоцитов [1, 2]. Учитывая вышесказанное, вполне очевидным является поиск препаратов, предупреждающих развитие ишемических и реперфузионных повреждений при инфаркте миокарда.

Ранее было показано, что повышенная активность блуждающего нерва оказывает кардиопротективное действие против реперфузионного повреждения миокарда, а ацетилхолин (ACh), основной нейротрансмиттер блуждающего нерва в сердце, воспроизводит кардиопротективные эффекты. Активация нейронных или не-нейронных холинергических путей, уменьшающих ишемическое повреждение, происходит посредством двух видов холинорецепторов – мускариновых и никотиновых [3–5]. Мускариновые холинорецепторы относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCRs – G protein-coupled receptors), а никотиновые к семейству лиганд-управляемых ионных каналов, и оба вида холинорецепторов присутствуют в сердце [6]. В зависимости от субъединичного состава существует несколько типов никотиновых холинорецепторов (нХР). Установлено, что активация нХР миокарда, в частности, нХР типа α7, во время ишемического повреждения может обеспечить терапевти-

[1]*Филиал ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино, Россия*
[2]*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*
**e-mail: utkin@ibch.ru*

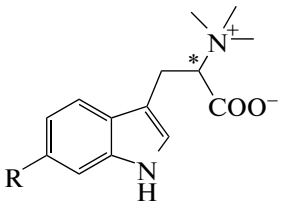


Рис. 1. Структурная формула 6-бромогипафорина (R = Br) и аналогов 6ND и 6ID (R – электроноакцепторный заместитель). * – асимметрический атом углерода, имеющий L-конфигурацию в 6-бромогипафорине и D-конфигурацию в аналогах 6ND и 6ID.

ческую защиту, улучшая сократительную функцию сердца и ограничивая размер инфаркта [7].

Ранее мы показали, что L-6-бромогипафорин (рис. 1), бром-содержащий аналог индола, является избирательным агонистом нХР типа α7 [8]. Нами получен ряд синтетических аналогов D-6-бромогипафирина, в которых атом брома заменен на другие электронакцепторные заместители (синтез и физико-химические характеристики будут опубликованы отдельно). Некоторые из полученных соединений, в частности аналоги 6ND и 6ID, продемонстрировали более высокую активность как агонисты нХР типа α7, чем природный L-6-бромогипафорин. В данной работе нами проведено исследование двух синтетических аналогов D-6-бромогипафорина (6ND и 6ID) с целью выявления их терапевтического потенциала для уменьшения реперфузионного повреждения после перенесенной ишемии миокарда у экспериментальных животных.

В опытах использовали самцов крыс аутбредной линии Sprague-Dawley (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН) возрастом 9–11 нед и массой 220–280 г. Все процедуры были одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка №766/20). Для наркотизации использовали уретан (1.5 г/кг внутрибрюшинно). Животным воспроизводили острый инфаркт миокарда путем окклюзии левой коронарной артерии (ЛКА) с ее последующей реперфузией при искусственной вентиляции легких с частотой дыхания 60–65 в минуту и дыхательным объемом 10 мл на 1 кг массы тела (Rodent Ventilator UGO BASILE 7025). Для введения тестируемых веществ и метиленового синего имплантировали катетер в яремную вену, для сбора крови – в правую сонную артерию. Доступ к коронарному сосуду производили путем торакотомии в четвертом межреберье слева. Вскрывали перикард, определяли локализацию общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА), под который с помощью атравматической иглы подводили тонкую полиамидную нить (ETHILON 6–0). Для создания обратимой ишемии миокарда из полиэтиленовой трубки PE-10 формировали окклюдер [9]. Во время проведения эксперимента поддерживали температуру тела животных на уровне 37 ± 1°C с помощью термостатируемой поверхности.

Для оценки кардиопротективных свойств агонистов α7 нХР животных подвергали 30-минутной окклюзии ЛКА с последующей 90-минутной реперфузией. В момент снятия окклюдера, на первой минуте реперфузии крысам вводили внутривенно 6ND (n = 8) или 6ID (n = 7) в дозах 0.05 мг/кг. Проведенные ранее в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН исследования показали, что оба соединения в такой дозе снижали воспаление у экспериментальных животных (полученные результаты будут опубликованы отдельно). Объем введения составлял 1 мл на кг веса животного. Контролем (n = 5) служили животные, которым вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме. Определение размеров анатомической зоны риска и зоны инфаркта производили с помощью методики “двойного окрашивания” 2% метиленовым синим и 1% хлоридом трифенилтетразолия (ТТХ) [10]. После окончания реперфузии вокруг коронарной артерии вновь затягивали лигатуру и внутривенно вводили раствор метиленового синего до визуализации границы между кровоснабжаемыми и ишемизированными отделами. Далее сердце быстро удаляли, отмывали в физиологическом растворе и разрезали в поперечном направлении на пять срезов одинаковой толщины. Полученные срезы инкубировали в течение 15 мин в растворе ТТХ при температуре 37°C и pH 7.4, затем фиксировали 5 мин в 10% формалине. Окрашенные срезы сканировали на сканере HP Laser Jet 3055 и обрабатывали полученные изображения с использованием программы Image TOOL. В каждом срезе подсчитывались зона инфаркта (неокрашенная ТТХ, находящаяся в пределах зоны риска), зона риска (окрашенная ТТХ) и площадь среза левого желудочка (для определения площади анатомической зоны риска). Общую площадь зоны инфаркта вычисляли по пяти срезам и представляли в процентном отношении от общей площади зоны риска. Затем таким же способом, как и в случае зоны инфаркта, вычисляли долю площа-

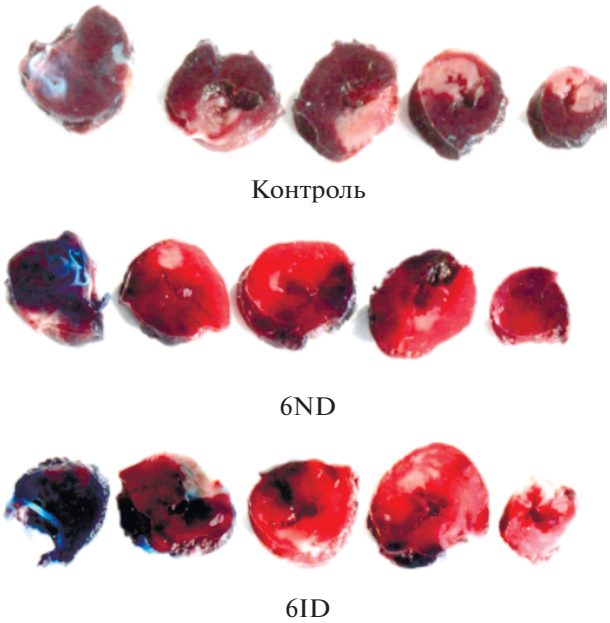


Рис. 2. Примеры послойных срезов левого желудочка крыс из контрольной и экспериментальных групп. Бледно-желтые участки зоны инфаркта (не окрашенные ТТХ) находятся в пределах зоны риска, окрашенной ТТХ в ярко кирпичный цвет. Неишемизированный миокард окрашен в темно-синий цвет.

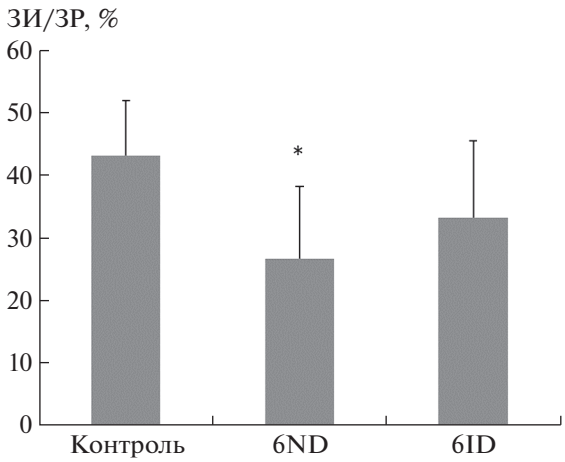


Рис. 3. Размер зоны инфаркта (ЗИ), выраженный в процентах от зоны риска (ЗР) в экспериментальных группах. * $p < 0.05$ относительно группы “Контроль” согласно *t*-тесту Стьюдента для независимых выборок.

ди анатомической зоны риска от общей площади левого желудочка для данного сердца.

Кровь в объеме 0.5 мл собирали из артериального катетера до момента окклюзии (исходные значения), а также в конце реперфузионного периода (после окклюзии-реперфузии). Анализ ионов (K^+, Na^+) выполняли с помощью анализатора электролитов EX-D фирмы JOKOH CO, LTD.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 7 for Windows. Данные представляли в виде “среднее ± ± стандартное отклонение”, изменения исследуемых показателей считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Определение анатомической зоны риска (ЗР) у трех групп животных, контрольных и получавших 6ND или 6ID, не выявило отличий, ее размеры составили 33.7 ± 7.1, 35.6 ± 5.6 и 30.8 ± 11.4%, соответственно, от общей площади левого желудочка, что свидетельствует об одинаковом объеме миокарда, подвергшегося ишемии. В то же время размер зоны инфаркта (ЗИ) различался в кон-

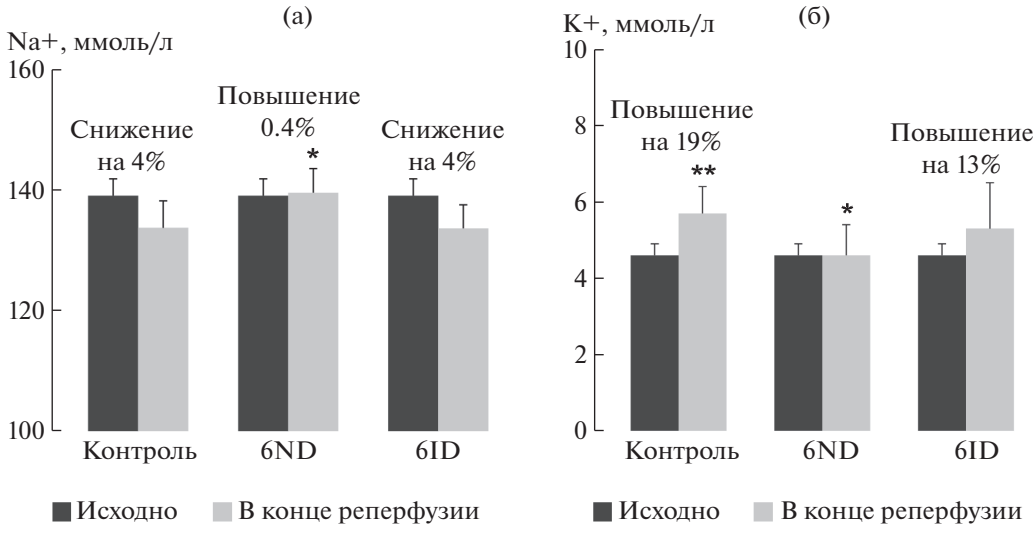


Рис. 4. Изменения концентраций ионов натрия (а) и калия (б) после окклюзионно-реперфузионного повреждения. * $p < 0.05$ относительно группы "Контроль в конце реперфузии" согласно *t*-тесту Стьюдента для несвязанных выборок. ** $p < 0.05$ относительно исходных значений согласно *t*-тесту Стьюдента для связанных выборок.

трольной группе и группах, которым вводили исследуемые аналоги 6-бромогипафорина (рис. 2). Так, введение 6ND на первой минуте реперфузии приводило к статистически достоверному снижению размера инфаркта до 26.8 ± 11.5% от зоны риска по сравнению с контролем, в котором эта величина составила 43.2 ± 8.8% (рис. 3). Введение 6ID также оказывало инфаркт-лимитирующее действие (33.3 ± 12.3%), однако менее эффективно.

Определение содержания электролитов в крови животных выявило изменение концентрации ионов калия и натрия после окклюзионно-реперфузионного повреждения (рис. 4). Так, в контрольной группе наблюдались повышение уровня ионов калия на 19% относительно исходных значений и компенсаторное снижение ионов натрия на 4%, однако это изменение не было статистически значимым. Подобные изменения концентраций наблюдались в группе, получавшей 6ID, тогда как при введении 6ND изменения концентраций ионов были минимальными (снижение концентрации ионов натрия на 0.4%, рис. 3), что свидетельствует о защитном действии соединения 6ND.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что активация нХР ведет к усилению клеточной пролиферации и выживаемости клеток [11, 12]. Тот факт, что активация нХР способствует клеточной пролиферации, позволяет предположить, что агонисты этих рецепторов могли бы применяться для улучшения регенерации тканей и защиты от клеточной гибели. Действительно, никотин и другие агонисты нХР оказывали защитный эффект в отношении нейронов при нейродегенеративных расстройствах [13, 14]. Особый интерес представляют нХР типа α7, так как эти рецепторы экспрессируются различными типами клеток, включая, в частности, иммунные клетки [15] и нейроны [16, 17]. Кроме того, эти рецепторы являются высокопроницаемыми для ионов кальция, что подразумевает их значительную роль в активации внутриклеточных процессов. Ранее было установлено, что активация α7 нХР на макрофагах приводит к снижению выброса ими провоспалительных цитокинов за счет ингибирования сигнального каскада с участием ядерного фактора κB (NF-κB) [18]. С другой стороны, в экспериментах на различных клетках активация нХР вызывала снижение концентрации активных форм кислорода. Возможно, ответственным за этот эффект является путь, включающий активацию α7 типа нХР и гемоксигеназы-1 – фермента, обусловливающего сильный антиоксидантный и антивоспалительный эффект [19]. Как уже отмечалось, активация нХР типа α7 во время ишемического повреждения ограничивает размер инфаркта [7]. Наши данные подтверждают кардиопротекторный эффект активации α7 нХР и показывают наличие такой активности у новых синтетических аналогов 6-бромогипафорина, являющихся селективными агонистами этого типа нХР.

При моделировании острого инфаркта миокарда у экспериментальных животных развиваются повреждения не только наружной клеточной мембраны, но и мембранных структур клеточных органелл, что ведет к мышечной слабости и дисфункции миокарда с последующей фибрилляцией или асистолией желудочков [20]. Выявленная гиперкалиемия у контрольных животных

подтверждает аномальный выход ионов во внеклеточное пространство вследствие гибели кардиомиоцитов. Введение 6ND предотвращало развитие этого процесса, снижая, по-видимому, активацию апоптических путей. Также в реперфузионном периоде происходит активация натрий-зависимых регуляторных механизмов – Na^+/H^+ обменника и $Na^+/HCO3^-$ котранспортера, приводящая к возрастанию внутриклеточной концентрации ионов натрия. Нами было обнаружено незначительное повышение (0.4%) концентрации ионов натрия при введении соединения 6ND; в контрольной группе и группе, получавшей 6ID, сывороточный уровень натрия снижался на 4%. Эти данные свидетельствуют о положительном эффекте соединения 6ND.

Таким образом, результаты наших исследований позволяют сделать вывод, что введение агониста α7 нХР 6ND в раннем реперфузионном периоде уменьшает размер инфаркта миокарда, повышая резистентность кардиомиоцитов к ишемическим/реперфузионным повреждениям.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научного проекта № 21-14-00316.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 766/20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yellon D.M., Hausenloy D.J.* Myocardial reperfusion injury // N. Engl. J. Med. 2007. V. 357. P. 1121–1135.
2. *Gunata M., Parlakpinar H.* A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment // Cell Biochem. Funct. 2021. V. 39. № 2. P. 190–217.
3. *La Croix C., Freeling J., Giles A., et al.* Deficiency of M-2 muscarinic acetylcholine receptors increases susceptibility of ventricular function to chronic adrenergic stress // Am. J. Physiol.-Heart C. 2008. V. 294. P. 810–820.
4. *Lara A., Damasceno D.D., Pireset R., et al.* Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. P. 1746–1756.
5. *Intachai K.C., Chattipakorn S., Chattipakorn N., et al.* Revisiting the Cardioprotective Effects of Acetylcholine Receptor Activation against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury // Int. J. Mol. Sci. 2018 V. 19. № 9. P. 2466.
6. *Li D.L., Liu B.H., Sun L., et al.* Alterations of muscarinic acetylcholine receptors-2, 4 and α7-nicotinic acetylcholine receptor expression after ischaemia/reperfusion in the rat isolated heart // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2010. V. 37. № 12. P. 1114–1119.
7. *Mavropoulos S.A., Khan S.N., Levy A.C.J., et al.* Nicotinic Acetylcholine Receptor–Mediated Protection of the Rat Heart Exposed to Ischemia Reperfusion // Mol. Med. 2017. V. 23. P. 120–133.
8. *Kasheverov I.E., Shelukhina I.V., Kudryavtsev D.S., et al.* 6-Bromohypaphorine from Marine Nudibranch Mollusk *Hermissenda crassicornis* is an Agonist of Human α7 Nicotinic Acetylcholine Receptor // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 1255–1266.
9. *Zhang Y., Gu E., Zhang J., et al.* Role of p38 mitogen activated protein kinases in cardioprotection of morphine preconditioning // Chinese Medical Journal. 2007. V. 120. P. 777–781.
10. *Schwarz E.R., Somoano Y., Hale S.L., et al.* What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarction size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat // J. Thromb. Thrombolysis 2000. V. 10. P. 181–187.
11. *Kaneko N., Okano H., Sawamoto K.* Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb // Genes Cells. 2006. V. 11. № 10. P. 1145–1159.
12. *Mashimo M., Iwasaki Y., Inoue S., et al.* Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca^{2+}, IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor // Life Sci. 2017. V. 172. P. 13–18.
13. *Picciotto M.R., Zoli M.* Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease // Front. Biosci. 2008. V. 13. P. 492–504.
14. *Echeverria V., Yarkov A., Aliev G.* Positive modulators of the α7 nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer's disease // Prog. Neurobiol. 2016. V. 144. P. 142–157.
15. *Shen J.X., Yakel J.L.* Functional alpha7 nicotinic ACh receptors on astrocytes in rat hippocampal CA1 slices // J. Mol. Neurosci. 2012. V. 48. P. 14–21.
16. *Corradi J., Bouzat C.* Understanding the Bases of Function and Modulation of α7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery // Mol. Pharmacol. 2016. V. 90. P. 288–299.
17. *Levin E.D.* α7-Nicotinic receptors and cognition // Curr. Drug Targets. 2012. V. 13. P. 602–606.
18. *Yue Y., Liu R., Cheng W., et al.* GTS-21 attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production in vitro by modulating the Akt and NF-κB signaling pathway through the α7 nicotinic acetylcholine receptor // Int. Immunopharmacol. 2015. V. 29. № 2. P. 504–512.
19. *Egea J., Buendia I., Parada E., et al.* Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection // Biochem. Pharmacol. 2015. V. 97. P. 463–472.
20. *Moens A.L., Clayes M.J., Timmermans J.P.* Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process // Int. J. Cardiol. 2005. V. 100. P. 179–190.

SYNTHETIC ANALOGS OF 6-BROMOHYPAPHORINE, A NATURAL AGONIST OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS, REDUCE CARDIAC REPERFUSION INJURY IN A RAT MODEL OF MYOCARDIAL ISCHEMIA

E. R. Shaykhutdinova[a], A. E. Kondrakhina[a], I. A. Ivanov[b], D. S. Kudryavtsev[b], I. A. Dyachenko[a], A. N. Murashev[a], Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin[b], and Yu. N. Utkin[b,#]

[a] *Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

[b] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: utkin@ibch.ru*

The data available to date indicate that the activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) of α7 type can reduce heart damage resulting from ischemia and subsequent reperfusion. We have studied two new synthetic D-analogs of 6-bromohypaphorine, which are selective agonists of α7 nAChR, in a rat model of myocardial ischemia. Acute myocardial infarction in animals was induced by occlusion of the left coronary artery with its subsequent reperfusion under mechanical lung ventilation. It was found that one of the analogs was more active and its introduction in the first minute of reperfusion led to a statistically significant decrease in the size of the infarction. This analog also prevented changes in the concentration of potassium and sodium ions in the blood, characteristic of occlusive-reperfusion injury. The data obtained indicate that hypaphorine analogs are promising for the development of drugs that reduce the adverse effects of myocardial infarction.

Keywords: myocardial infarction, reperfusion injury, 6-bromohypaphorin, synthetic analogs, nicotinic acetylcholine receptor

EDN: IXHLBU
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 144–151

УДК 577.152.242

ПОЛУЧЕНИЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ АНАЛОГОВ ПУРИНОВЫХ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ

© 2022 г. М. С. Дреничев[1], Е. О. Доринова[1], И. В. Варижук[1], В. Е. Ословский[1], М. А. Варга[1], Р. С. Есипов[2], Д. Д. Лыкошин[2], К. С. Алексеев[1,*,]**

Представлено академиком РАН С.Н. Кочетковым
Поступило 27.10.2021 г.
После доработки 01.12.2021 г.
Принято к публикации 01.12.2021 г.

В работе проведен сравнительный анализ условий трансгликозилирования, катализируемого нуклеозидфосфорилазами *E. coli*, и определены оптимальные условия образования различных нуклеозидов. В условиях реакции трансгликозилирования, исходя из рибонуклеозидов, получены фторсодержащие производные N^6-бензил-2'-дезоксиаденозина – потенциальные ингибиторы репликации энтеровирусов в клетке.

Ключевые слова: аденозин, 7-метилгуанозин, нуклеозидфосфорилаза, ферменты, трансгликозилирование, фторсодержащие производные, бензиладенин

DOI: 10.31857/S268673892202007X

ВВЕДЕНИЕ

Методы ферментативного трансгликозилирования широко применяются для получения лекарственных веществ на основе нуклеозидов и их аналогов и основаны на реакции переноса углеводного остатка с одного гетероциклического основания на другое [1–3]. В качестве катализаторов данных реакций выступают нуклеозидфосфорилазы (НФ), которые осуществляют обратимый фосфоролиз рибонуклеозидов/2'-дезоксирибонуклеозидов с образованием соответствующего гетероциклического основания и α-*D*-(2-дезокси)рибофуранозо-1-фосфата ((d)Rib-P). Равновесие реакции фосфоролиза сдвинуто в сторону образования нуклеозидов, причем в случае пуриновых более значительно [1–6]. Обычно используют сопряженные реакции фосфоролиза – нуклеозида-донора углеводной части и нуклеозида, содержащего гетероциклическое основание-акцептор (рис. 1). Эта общая схема позволяет получать новые модифицированные нуклеозиды в зависимости от набора используемых исходных соединений и субстратной специфичности НФ.

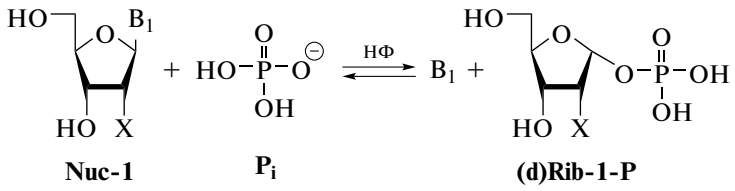
Ранее в лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений (ДиСБАС) ИМБ РАН были изучены подходы к оптимизации реакции трансгликозлирования с использованием 7-метил-2'-дезоксигуанозина в качестве исходного субстрата для получения α-*D*-2-дезоксирибозо-1-фосфата (dRib-1-P), 5-замещенных производных 2'-дезоксиуридина, кладрибина и аллопуринол-рибозида [5, 7], была предложена математическая модель процесса трансгликозилирования, которая может применяться для количественной оценки влияния начальных условий на результат трансгликозилирования [8]. Настоящая работа является продолжением ранее начатых исследований, целью которых являются расширение знаний о субстратной специфичности НФ и получение модифицированных аналогов природных нуклеозидов методом ферментативного трансгликозилирования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы был проведен сравнительный анализ реакции трансгликозилирования с участием пуриновых (ПНФ) и пиримидиновых (УрФ, ТФ) нуклеозидфосфорилаз *E. coli* (табл. 1). Выбор ферментов бактериального происхождения в качестве катализаторов был обусловлен их

[1]*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия*
[2]*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия*
**e-mail: room517@eimb.ru*
***e-mail: micelle@mail.ru*

Стадия 1: Фосфоролиз нуклеозида



Стадия 2: Синтез нового нуклеозида (перенос углеводного остатка на другое основание B_2)

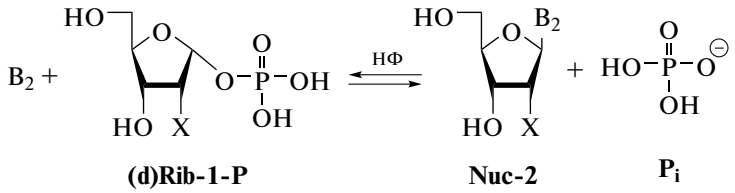


Рис. 1. Реакция трансгликозилирования. НФ – нуклеозидфосфорилазы, Nuc-1 – нуклеозид-донор, Nuc-2 – целевой нуклеозид, B_1 и B_2 – гетероциклические основания, P*i* – фосфат-анион, X=H или OH. Условия реакций: НФ – ПНФ *E. coli*, УрФ *E. coli*, ТФ *E. coli*, 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 7.5), 20°C. Составлено по материалам работы [6].

широкой субстратной специфичностью, оптимумом pH в нейтральной/слабощелочной средах и достаточно широким рабочим интервалом температур, что позволяет проводить реакцию в мягких условиях без заметного неспецифического расщепления *N*-гликозидной связи с выходами целевых продуктов, близкими к теоретически предсказываемым [8–13].

Согласно рис. 1, реакция трансгликозилирования протекает через стадию образования α-*D*-рибозо-1-фосфата (Rib-1-P) или α-*D*-2-дезоксирибозо-1-фосфата (dRib-1-P). В синтезе пуриновых нуклеозидов из пиримидиновых и наоборот требуется участие двух ферментов: ПНФ и УрФ (или ТФ). Константы равновесия фосфоролиза природных пиримидиновых нуклеозидов в присутствии УрФ и ТФ выше, чем константы равновесия фосфоролиза природных пуриновых нуклеозидов в присутствии ПНФ [2, 5, 8, 11, 14], поэтому более целесообразно использование в качестве доноров Rib-1-P и dRib-1-P пиримидиновых нуклеозидов, а не пуриновых [8, 15, 16].

Хорошо подтверждают эту целесообразность экспериментальные данные, приведенные в табл. 1.

При получении аденозина из уридина реакция протекала с высоким выходом, который определяли как отношение равновесной концентрации продукта к начальной концентрации исходного основания или гликозил-донора в зависимости от того, что было взято в недостатке (табл. 1, строки 1–3, 77–94% по данным ВЭЖХ). При получении уридина из аденозина выход реакции значительно снижался (табл. 1, строки 4–6, 22–27% по данным ВЭЖХ). В ряду пуриновых нуклеозидов инозин выступал в качестве более продуктивного гликозил-донора, чем аденозин, поэтому реакция получения аденозина из инозина протекала с более высоким выходом (табл. 1, строка 8, 76% по данным ВЭЖХ), чем обратная реакция (табл. 1, строка 7, 53% по данным ВЭЖХ). С повышением количества нуклеозида-донора в реакционной смеси закономерно удается повысить выход целевого нуклеозида (и, соответственно, конверсию основания), но при этом также увеличивается количество непрореагировавших компонентов, что увеличивает трудоемкость последующей обработки реакционной смеси и ее очистку (табл. 1, строки 3, 6, 13, 15).

Упрощение реакции трансгликозилирования может быть проведено двумя путями:

1) исключение стадии фосфоролиза нуклеозида, выступающего в качестве гликозил-донора в реакции трансгликозилирования (рис. 1, стадия 1), введением в реакцию готового Rib-1-P или dRib-1-P [7];

2) превращение стадии 1 в необратимую, используя в качестве источника рибозного остатка 7-метил-(2'-дезокси)гуанозина (7-Me(d)Guo) за счет его практически необратимого фосфоролиза [17, 18].

Использование (d)Rib-1-P уменьшает число компонентов в составе реакционной смеси, облегчает выделение целевых соединений и позво-

Таблица 1. Сравнительный анализ условий трансгликозилирования, катализируемого нуклеозидфосфорилазами *E. coli*.[1]

№	Гликозил-донор (Д)	Основание (О)	Продукт	Д: О: P_i (моль)	Фермент	Выход (по данным ВЭЖХ)	Конверсия основания О в нуклеозид (по данным ВЭЖХ)
1	Urd	Ade	Ado	1:1.5:1	УрФ/ПНФ	77%	51%
2	Urd	Ade	Ado	1.5:1:1	УрФ/ПНФ	88%	88%
3	Urd	Ade	Ado	3:1:2	УрФ/ПНФ	94%	94%
4	Ado	Ura	Urd	1:1.5:1	ПНФ/УрФ	22%	13%
5	Ado	Ura	Urd	1.5:1:1	ПНФ/УрФ	22%	22%
6	Ado	Ura	Urd	3:1:0.5	ПНФ/УрФ	27%	27%
7	Ado	Hyp	Ino	1:1.5:1	ПНФ	53%	35%
8	Ino	Ade	Ado	1:1.5:1	ПНФ	76%	53%
9	7-Me-Guo	Ura	Urd	1:1.5:1	ПНФ/УрФ	63%	42%
10	7-Me-Guo	Ura	Urd	1.5:1:1	ПНФ/УрФ	80%	80%
11	7-Me-Guo	Ade	Ado	1:1.5:1	ПНФ	79%	52%
12	7-Me-Guo	Ade	Ado	1.5:1:1	ПНФ	94%	94%
13	7-Me-Guo	Ade	Ado	3:1:2	ПНФ	100%	99%
14	Rib-P	Ade	Ado	1:1.5	ПНФ	98%	66%
15	Thd	5-Et-Ura	5-Et-Urd	5:1:0.5	ТФ	80%	80%
16	7-Me-dGuo	PFPh-Ade	PFPh-dAdo	1.5:1:1	ПНФ	89%	89%
				1.5:1:0.5		95%	95%
				1.5:1:0.25		97%	97%
17	7-Me-dGuo	TFMBn-Ade	TFMBn-dAdo	1.5:1:1	ПНФ	96%	96%
				1.5:1:0.5		98%	98%
				1.5:1:0.25		100%	100%

[1]Условия реакции: Реакции проводились в пластиковых пробирках 1.5 мл, объем реакционной смеси 1 мл в 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5) буфере, концентрации субстратов Д: О: Pi в диапазоне 0.01–1 мМ, 0.35 ед. ПНФ *E. coli*, 0.34 ед. УФ *E. coli*.[1]Условия анализа: линейный градиент 2–12% CH_3CN в 0.08% водном растворе ТФУ за 10 мин, колонка 4.6 × 150 mm Luna C18(2) (строки 1–6, 9–15); 0.5–3% CH_3CN в 0.08% водном растворе ТФУ за 15 мин, колонка 4.6 × 150 mm Luna C18(2) (строки 7, 8); 2–60% CH_3CN в 10 мМ водном растворе ацетата натрия за 25 мин, колонка 4.6 × 250 mm Nucleosil C18 (строки 16, 17).

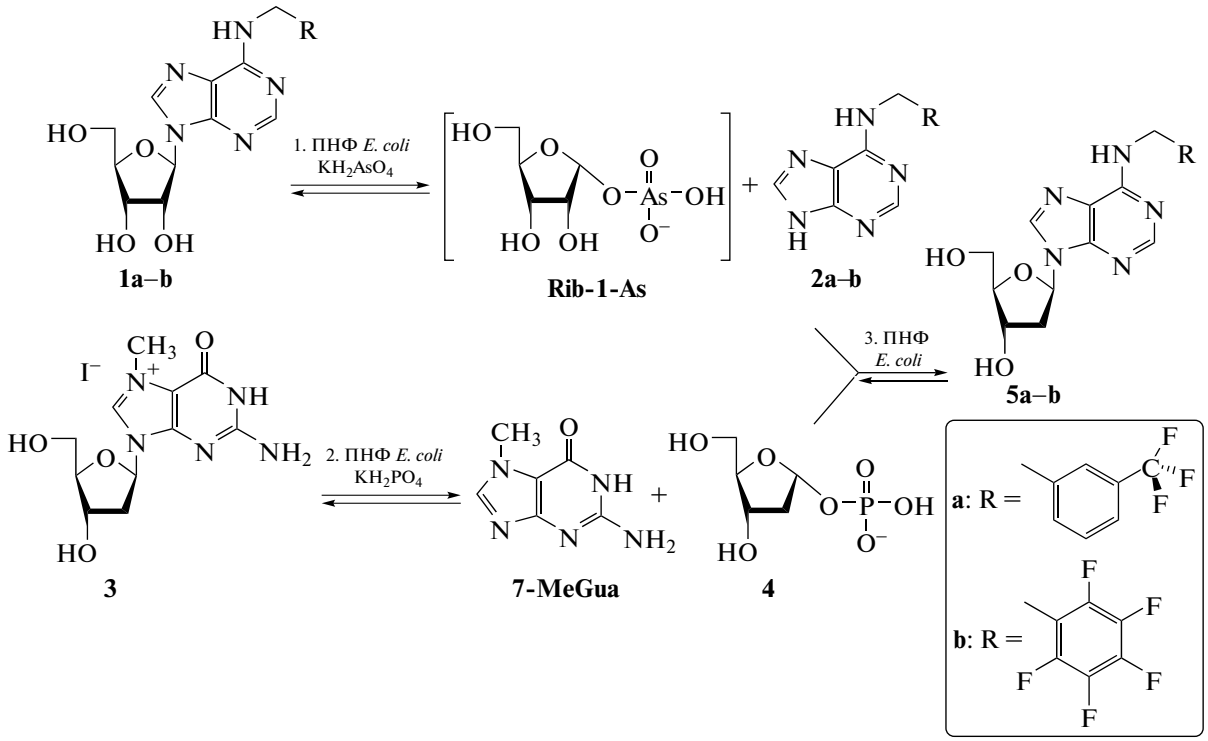


Рис. 2. Синтез фторсодержащих 2'-дезоксирибонуклеозидов из рибонуклеозидов. *Реагенты и условия*: (1) **1a–b** (0.212–0.235 ммоль), ПНФ *E. coli* (0.25 единиц), KH_2AsO_4 (0.212–0.235 ммоль), 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 7.5, 10 мл), 50°C, 20 ч – **2a** (91%), **2b** (85%). (2–3). **2a** (20 мг, 0.068 ммоль), **2b** (20 мг, 0.064 ммоль), **3** (0.102 ммоль), ПНФ *E. coli* (0.98 единиц), KH_2PO_4 (0.064–0.068 ммоль), 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 7.5, 63 мл) – ДМСО (10%, 7 мл), 20°C, 24 ч – 86% (**5a**), 47% (**5b**).

ляет существенно сместить равновесие реакции гликозилирования в сторону образования нуклеозидов (табл. 1, строка 14, 98% по данным ВЭЖХ, выход рассчитывался по реагенту, взятому в недостатке – Rib-1-P). Замена (d)Rib-1-P на более доступный 7-Me(d)Guo приводит к сравнимым выходам продуктов реакции (табл. 1).

ПНФ *E. coli* была применена для получения из коммерчески более доступных рибонуклеозидов менее доступных дезоксирибонуклеозидов: N^6-пентафторфенилметил-2'-дезоксиаденозина (PFPh-dAdo, **5b**) и N^6-(3-трифторметилбензил)-2'-дезоксиаденозина (TFMBn-dAdo, **5a**) (рис. 2) – потенциальных ингибиторов репликации энтеровирусов в клетке [19].

Метод синтеза состоял из трех раздельных стадий, протекание каждой стадии катализировалось ПНФ *E. coli*. Исходные основания N^6-(3-трифторметилбензил)аденин (TFMBn-Ade, **2a**) и N^6-пентафторфенилметиладенин (PFPh-Ade, **2b**) были получены из рибонуклеозидов в условиях ферментативного арсенолиза (рис. 2, стадия 1). В основе ферментативного арсенолиза лежит расщепление рибонуклеозида в присутствии дигидроортоарсената калия (KH_2AsO_4) на пуриновое основание и высоко лабильный α-*D*-рибофуранозо-1-арсенат (Rib-1-As), который необратимо гидролизуется, что смещает равновесие расщепления рибонуклеозида в сторону образования основания [20]. К смещению равновесия также приводит плохая растворимость гетероциклических оснований **2a** и **2b** в воде и в Tris-HCl буфере. Для предотвращения образования смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидов в ходе дальнейших стадий стадия 1 должна проводиться в отдельной колбе. Далее основания **2a** и **2b** отфильтровывали и вводили в реакцию трансгликозилирования с 7-Me-dGuo в присутствии дигидроортофосфата калия и ПНФ *E. coli* (рис. 2, стадии 2–3). В реакционной смеси 7-Me-dGuo превращался в dRib-1-P (рис. 2, стадия 2), который далее вступал в реакцию с фторсодержащим основанием (рис. 2, стадия 3). Стадии 2 и 3 проводились в одной колбе. Для увеличения растворимости основания реакцию проводили в буферном растворе с добавлением 10% (об.) диметилсульфоксида.

Концентрация диметилсульфоксида в реакционной смеси не влияла существенным образом на ферментативную активность ПНФ, что согласуется с литературными данными [18]. Реакцию трансгликозилирования проводили при разных соотношениях гликозил-донор: основание : фос-

фат (табл. 1). Проведение реакции с небольшим избытком гликозил-донора в присутствии эквимолярного количества фосфата (1.5: 1: 1) или его недостатка (1.5: 1: 0.5, 1.5: 1: 0.25) приводило к высоким выходам целевых нуклеозидных продуктов при незначительном падении скорости реакции по сравнению со скоростью реакции в присутствии эквимолярных количеств фосфата. С повышением количества фосфата в реакционной смеси (начиная с эквимолярного количества и выше) возрастает скорость образования dRib-1-P, гидролиз которого может снижать выходы целевых нуклеозидов (табл. 1, строки 16–17), поэтому наибольшие выходы были достигнуты при соотношении гликозил-донор: основание: фосфат – 1.5:1:0.25 (табл. 2). Выход препаративного метода получения продукта **5a** составил 100% по ВЭЖХ (86% после очистки методом обращенно-фазной хроматографии на силикагеле-C_{18}), продукта **5b** – 92% по данным ВЭЖХ (47% после аналогичной очистки, низкий выход обусловлен сорбцией вещества на силикагеле-C_{18}).

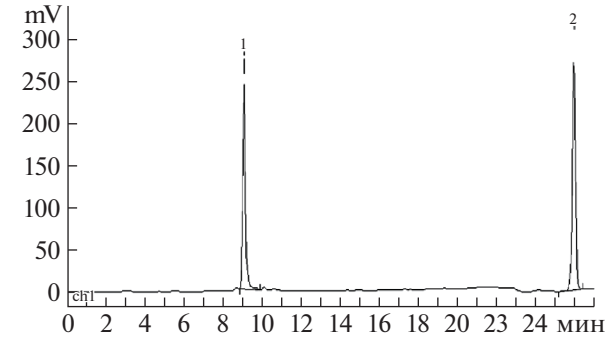
Структура полученных соединений была подтверждена методами ЯМР-спектроскопии. В ^{13}C-ЯМР спектре трифторметилзамещенного дезоксинуклеозида **5a** присутствовал резонансный сигнал трифторметильной группы в виде квартета низкой интенсивности с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^1J_{C-F}$ = 31 Гц. В ^{13}C-ЯМР спектре пентафторзамещенного дезоксинуклеозида **5b** присутствовали резонансные сигналы ядер ^{13}C фенильной группы в виде трех широких дублетов с КССВ $^1J_{C-F}$ порядка 250 Гц. В ^{19}F-ЯМР спектре сигнал трифторметильной группы соединения **5a** был разрешен в виде синглета с химическим сдвигом δ = 61.4 м.д. ^{19}F-ЯМР спектр пентафторзамещенного нуклеозида **5b** показывает сложное спин-спиновое взаимодействие: дублет дублетов для ядер ^{19}F в *орто*-положении фенильного заместителя с КССВ $^3J_{F-F}$ = 22 Гц, $^4J_{F-F}$ = 6 Гц, триплет дублетов для ядер ^{19}F в *мета*-положении с КССВ $^3J_{F-F}$ = 22 Гц, $^4J_{F-F}$ = 6 Гц и триплет для ядер ^{19}F в *пара*-положении фенильного кольца с КССВ $^3J_{F-F}$ = 22 Гц. Наличие пентафторзамещенного фрагмента в составе структуры **5b** подтверждалось также спектром ^{1}H-ЯМР, в котором не наблюдались резонансные сигналы протонов фенильной группы.

В настоящее время проводится изучение противовирусной активности полученных соединений.

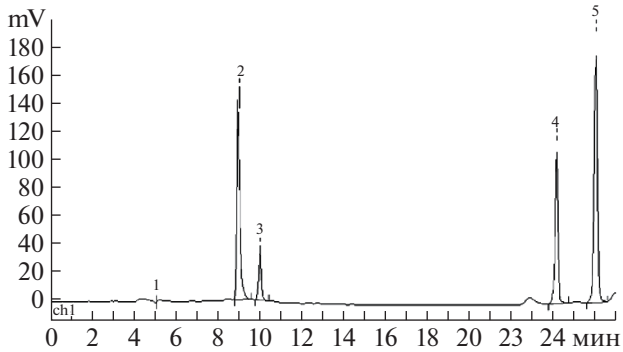
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения реакций и выделения веществ использовались коммерчески доступные реагенты и растворители. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ-анализа на приборе Стайер-М (Аквилон, Россия). Условия ВЭЖХ анализа: колонка 4.6 × 250 мм (Nucleosil 100-5 C18, 5 мкм, Macherey-Nagel GmbH&Co. KG) линейный градиент ацетонитрила в 10 мМ растворе ацетата натрия в деионизированной воде от 2 до 60% в течение 25 мин (с дальнейшей промывкой в системе 60–80% ацетонитрил/10 мМ NaOAc в H_2O за 25–25.1 мин, затем 80–2% за 25.1–25.9 мин) при ско-

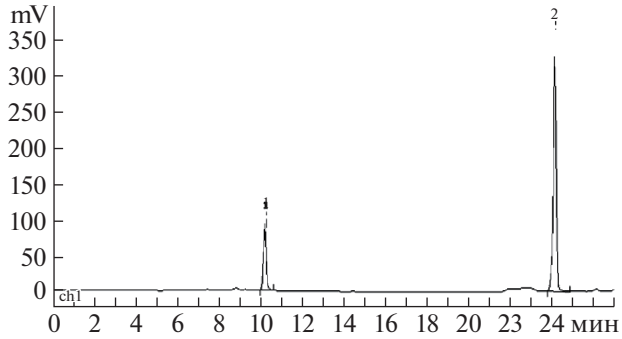
Таблица 2. ВЭЖХ-анализ реакции образования нуклеозида **5a** из основания **2a** и 7Me-dGuo (3) в присутствии ПНФ *E. coli*



A ($t_{initial}$): 1 – 7Me-dGuo (**3**); 2 – TFMBn-Ade (**2a**)



B (35 мин): 2 – 7Me-dGuo (**3**); 3 – 7-MeGua; 4 – TFMBn-dAdo (**5a**), 5 – TFMBn-Ade (**2a**)



C ($t_{equilibrium}$): 1–7-MeGua, 2 – TFMBn-dAdo (**5a**)

Условия анализа: Nucleosil 100–5 C18 4.6 × 250 мм (5 мкм, Macherey-Nagel GmbH&Co. KG), MeCN в 10 мМ NaOAc/H_2O от 2 до 60% (25 мин) (с дальнейшей промывкой в системе 60–80% MeCN/10 мМ NaOAc/H_2O за 25–25.1 мин, затем 80–2% за 25.1–25.9 мин), поток 1 мл/мин, УФ – 265 нм.

рости потока 1 мл/мин, УФ детекция производилась при 265 нм, объем пробы 20 мкл. ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker AMX 400 (Германия). Величины констант спин – спинового взаимодействия (КССВ, *J*) измерены в герцах (Гц). При описании спектров ЯМР приняты следующие сокращения: с – синглет, ус – уширенный синглет, д – дублет, дд – дублет дублетов, ддд – дублет дублетов дублетов, т – триплет, дт – дублет триплетов, м – мультиплет. Калибровку спектров ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР проводили по остаточному сигналу растворителя DMSO-d_6 (2.50 и 39.52 м.д).

Получение N^6-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденина (2b)

К смеси N^6-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденозина **1b** (95 мг, 0.212 ммоль) и KH_2AsO_4 (38 мг, 0.212 ммоль, 1 экв) в 50 мМ трис-HCl буфере pH 7.5 (10 мл) добавляли ПНФ (0.050 мл, 5 единиц активности) и выдерживали смесь при 50°C в течение 20 ч. В ходе реакции наблюдались растворение исходного нуклеозида и кристаллизация продукта. Через 20 ч реакционную смесь остужали до комнатной температуры и выдерживали 24 ч при +4°C. Выпавший осадок фильтровали, промывали водой (5 × 5 мл) и сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 в течение суток. Выход 57 мг (85%) в виде белого порошка. R_f = 0.4 (CH_2Cl_2: EtOH-95: 5 *v*/*v*). ^{1}H–ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ = 12.96 (уш с, 1H, N9H), 8.21 (с, 1H, H2-Ade), 8.15 (уш с, 1H, N^6H), 8.11 (с, 1H, H8-Ade), 4.83 (уш с, 1H, N^6CH_2). ^{19}F-ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ = –142.50 (дд, $^3J_{F–F}$ = 24.0 Гц, $^4J_{F–F}$ = 7.9 Гц), –156.85 (т, $^3J_{C–F}$ = = 22.1), –163.68 (тд, $^3J_{F–F}$ = 23.1 Гц, $^4J_{F–F}$ = 7.8 Гц).

Получение N^6-(3-трифторметилбензил)аденина (2a)

Методика аналогична получению N^6-(2,3,4,5,6–пентафторбензил)аденина (**2b**), исходя из N^6-(3-трифторметилбензил)аденозина (**1a**) (100 мг, 0.235 ммоль). Выход **2a** 63 мг (91%) в виде белого порошка. R_f = 0.42 (CH_2Cl_2:EtOH – 95:5 *v*/*v*). ^{1}H–ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): δ = 12.95 (уш с, 1H, N9H), 8.29 (уш с, 1H, N^6H), 8.17 (с, 1H, H2–Ade), 8.12 (с, 1H, H8-Ade), 8.0–7.4 (м, 4H, Ph), 4.81 (уш с, 1H, N^6CH_2). ^{19}F-ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ = = –61.00.

Получение N^6-(3-трифторметилбензил)-2'-дезоксиаденозина (5a)

К 70 мл раствора 7-метил-2'-дезоксигуанозина (41.82 мг, 0.102 ммоль), мета-трифторметилбензиладенина (20.00 мг, 0.068 ммоль) и дигидрофосфата калия (2.32 мг, 0.017 ммоль) в 50 мМ Трис-HCl-буфере (pH 7.5) с добавлением 10% (об.) ДМСО при комнатной температуре добавляли 0.98 ед. ПНФ *E. coli* (10 мкл раствора 1.0 мг/мл-Sigma с концентрацией 98 ед/мл), аккуратно перемешивали 5 мин и оставляли при комнатной температуре на 24 ч. Выпавший осадок 7-метилгуанина отфильтровывали через нейлоновую мембрану Phenomenex (диаметр 47 мм, размер пор 0.2 мкм). Отфильтрованный прозрачный раствор упаривали в вакууме до объема ~7 мл, разбавляли водой (7 мл) и наносили на колонку с обращенно-фазным сорбентом C_{18}. Выход: 99% (ВЭЖХ, количественный). Колонку промывали смесью вода : этанол с градиентом концентрации этанола 0–20%. Продукт элюировали в системе вода : этанол-60: 40. Фракции, содержащие продукт, объединяли, упаривали в вакууме, соупаривали с этанолом. Выход после выделения и очистки составил 26 мг (86%) в виде пены. ^{1}H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ = 8.51 (уш с, 1H, N^6H-Ade), 8.38 (с, 1H, H2-Ade), 8.21 (с, 1H, H8-Ade), 7.71 с (1H, *o*-H, Ph), 7.65 д (1H, ^3J = 7.2, *p*-H, Ph), 7.60–7.49 м (2H, Ph), 6.36 дд (1H, $J_{1'2'a}$ = 7.6, $J_{1'2'b}$ = 6.2, H-1'), 5.32 уш с (1H, 3'-OH), 5.19 уш.с (1H, 5'-OH), 4.79 уш с (2H, CH_2), 4.46–4.38 м (1H, H-3'), 3.89 тд (1H, $J_{4'5'a}$ = $J_{4'3'}$ = 4.2, $J_{4'5'b}$ = 2.6, H-4'), 3.62 уш.д. (1H, $J_{5'a5'b}$ = –11.7, H-5'a), 3.52 уш.д. (1H, $J_{5'b5'a}$ = –11.7, H-5'b), 2.73 ддд (1H, $J_{2'a2'b}$ = –13.3, $J_{2'a1'}$ = 7.6, $J_{2'b3'}$ = = 5.9, H-2'a), 2.27 ддд (1H, $J_{2'b2'a}$ = –13.3, $J_{2'b1'}$ = 6.2, $J_{2'b3'}$ = 2.6, H-2'b). ^{13}-C-ЯМР (150 МГц, DMSO-d_6): 154.37 (C-2), 152.32 (C-4), 141.59 (C-6), 139.74 (C-8), 131.33 (Ph), 129.29 (Ph), 128.90 q ($^1J_{C–F}$ = 31.4, CF_3), 123.65 q ($^3J_{C–F}$ = 3.8, Ph), 123.43 q ($^3J_{C–F}$ = 3.7, Ph), 119.68 (C-5), 88.03 (C-1'), 83.97 (C-3'), 70.94 (C-4'), 61.87 (C-5'), 42.62 (CH_2), 39.47 (C-2'). ^{19}F-ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ = –61.04.

Получение N^6-(2,3,4,5,6-пентафторфенил-1-метил)-2'-дезоксиаденозина (5b)

Методика аналогична предыдущей, исходя из N^6-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)аденина (20.00 мг, 0.064 ммоль). Очистку проводили на колонке с обращенно-фазным сорбентом C_{18} с использованием в качестве подвижной фазы смеси вода : этанол с градиентом концентрации этанола 0–20%. Выход 13 мг (47%) в виде белой серебристой пены. ^{1}H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ = 8.37 (с, 1H, H2-Ade), 8.35 (уш с, 1H, N^6H-Ade), 8.25 (с, 1H, H8-Ade), 6.35 дд (1H, $J_{1'2'a}$ = 7.6, $J_{1'2'b}$ = 6.2, H-1'), 5.30 уш с (1H, 3'-OH), 5.14 уш.т (1H, $J_{5'OH}$ = 4.2, 5'-OH), 4.82 уш с (2H, CH_2), 4.45–4.37 м (1H, H-3'), 3.87 тд (1H, $J_{4'5'a}$ = $J_{4'3'}$ = 4.3, $J_{4'5'b}$ = 2.8, H-4'), 3.62 уш.д. (1H, $J_{5'a5'b}$ = –11.7, H-5'a), 3.55–3.45 м (1H, H-5'b), 2.72 ддд (1H, $J_{2'a2'b}$ = –13.3, $J_{2'a1'}$ = 7.7, $J_{2'b3'}$ = 5.8, H-

2'a), 2.27 ддд (1H, $J_{2'b2'a}$ = –13.3, $J_{2'b1'}$ = 6.1, $J_{2'b3'}$ = 2.8, H-2'b). ^{13}C-ЯМР (150 МГц, DMSO-d_6): 153.85 (C-2), 152.14 (C-4), 148.57 (C-6), 145.10 дддд ($^1J_{C–F}$ = = 245.8, $^2J_{C–F}$ = 13.2, $^2J_{C–F}$ = 9.1, $^3J_{C–F}$ = 3.9, *орто*-C_6F_5), 139.79 (C-8), 139.68 дддд ($^1J_{C–F}$ = 250.5, $^2J_{C–F}$ = = 13.7, $^2J_{C–F}$ = 12.4, $^3J_{C–F}$ = 5.6, *мета*-C_6F_5), 136.69 дтт ($^1J_{C–F}$ = 248.8, $^2J_{C–F}$ = 12.6, $^3J_{C–F}$ = 3.9, *пара*-C_6F_5), 119.65 (C-5), 113.01 т ($^2J_{C–F}$ = 17.6, *C-1*-C_6F_5), 87.98 (C-1'), 83.88 (C-3'), 70.88 (C-4'), 61.81 (C-5'), 39.42 (C-2'), 32.22 (CH_2). ^{19}F-ЯМР (282 МГц, DMSO-d_6): δ = –142.50 дд ($^3J_{F–F}$ = 22 Гц, $^4J_{F–F}$ = 6 Гц), –156.74 т ($^3J_{F–F}$ = 22 Гц), –163.65 тд ($^3J_{F–F}$ = 22 Гц, $^4J_{F–F}$ = 6 Гц).

ВЫВОДЫ

В ходе работы был проведен сравнительный анализ условий трансгликозилирования в присутствии нуклеозидфосфорилаз *E. coli*, который позволил оптимизировать условия ферментативного синтеза N^6-пентафторфенилметил-2'-дезоксиаденозина и N^6-(3-трифторметилбензил)-2'-дезоксиаденозина, потенциальных нуклеозидных ингибиторов репликации энтеровирусов в клетке.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 21-14-00346).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I.* Biologically important nucleosides: modern trends in biotechnology and application // Mendeleev СомMun. 2011. V. 21. № 2. P. 57–68.
2. *Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I.* New trends in nucleoside biotechnology // Acta Naturae. 2010. V. 2. № 5. P. 36–56.
3. *Iglesias L.E., Lewkowicz E.S., Medici R., Bianchi P., Iribarren A.M.* Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs. // Biotechnol. Adv., 2015. V. 33. № 5. P. 412–434.
4. *Parker W.B.* Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. // Chem. Rev. 2009. V. 109. № 7. P. 2880–2893.
5. *Goldberg R.N., Tewari Y.B., Bhat T.N.* Thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions – a database for quantitative biochemistry. // Bioinformatics. 2004. V. 20. P. 2874–2877.
6. *Drenichev M.S., Alexeev C.S., Kurochkin N.N. et al.* Use of nucleoside phosphorylases for the preparation of purine and pyrimidine 2'-deoxynucleosides. // Adv. Synth. Catal. 2018. V. 360. P. 305–312.
7. *Kulikova I.V., Drenichev M.S., Solyev P.N., Alexeev C.S. and Mikhailov S.N.* Enzymatic Synthesis of 2-Deoxyribose 1-Phosphate and Ribose 1 Phosphate and Subsequent Preparation of Nucleosides. // Eur. J. Org. Chem. 2019. P. 6999–7004.
8. *Alexeev C.S., Kulikova I.V., Gavryushov S. et al.* Quantitative prediction of yield in transglycosylation reaction catalyzed by nucleoside phosphorylases. // Adv. Synth. Catal. 2018. V. 360. P. 3090–3096.
9. *Ubiali D., Rocchietti S., Scaramozzino F., Terreni M., Albertini A.M., Fernandez-Lafuente R., Guisa J.M., Pregnolato M.* Synthesis of 2'-Deoxynucleosides by Transglycosylation with New Immobilized and Stabilized Uridine Phosphorylase and Purine Nucleoside Phosphorylase. //Adv. Synth. Catal. 2004. V. 346. P. 1361–1366.
10. *Gordon G.E.R., Visser D.F., Brady D., Raseroka N., Moira L., Bode M.L.* Defining a process operating window for the synthesis of 5-methyluridine by transglycosylation of guanosine and thymine. // Journal of Biotechnology. 2011. V. 151. P. 108–113.
11. *Serra I., Bavaro T., Cecchinia D.A., Daly S., Albertini A.M., Terrenia M., Ubiali D.* A comparison between immobilized pyrimidine nucleoside phosphorylase from Bacillus subtilis and thymidine phosphorylase from Escherichia coli in the synthesis of 5-substituted pyrimidine 2-deoxyribonucleosides. // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013. V. 95. P. 16–22.
12. *Cattaneo G., Rabuffetti M., Speranza G., Kupfer T., Peters B., Massolini G., Ubiali D., Calleri E.* Synthesis of Adenine Nucleosides by Transglycosylation using Two Sequential Nucleoside Phosphorylase-Based Bioreactors with On-Line Reaction Monitoring by using HPLC. // ChemCatChem. 2017. V. 9. P. 4614–4620.
13. *Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D.* Properties of Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP) of Mammalian and Bacterial Origin. // Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences. 1990. V. 45. P. 59–70.
14. *Alexeev C.S., Drenichev M.S., Dorinova E.O., Esipov R.S., Kulikova I.V., Mikhailov S.N.* Use of nucleoside phosphorylases for the preparation of 5-modified pyrimidine ribonucleosides. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics. V. 1868. P. 140292.
15. *Roivainen J., Elizarova T., Lapinjoki S., Mikhailopulo I.A., Esipov R.S., Miroshnikov A.I.* An Enzymatic Transglycosylation of Purine Bases. // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2007. P. 905–909.
16. *Zuffi G., Ghisotti D., Oliva I., Capra E., Frascotti G., Tonon G., Orsini G.* Immobilized Biocatalysts for the Production of Nucleosides and Nucleoside Analogues by Enzymatic Transglycosylation Reactions. // Biocatalysis and Biotransformation. 2004. V. 22. P. 25–33.
17. *Kulikowska E., Bzowska A., Wierzchowski J., Shugar D.* Properties of two unusual, and fluorescent, substrates of purine-nucleoside phosphorylase: 7-methylguanosine and 7-methylinosine. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 874. P. 355–363.
18. *Rabuffetti M., Bavaro T., Semproli R., Cattaneo G., Massone M., Morelli C.F., Speranza G., Ubiali D.* Synthesis

of ribavirin, tecadenoson, and cladribine by enzymatic transglycosylation. // Catalysts. 2019. V. 9. P. 355.

19. *Oslovsky V.E., Drenichev M.S., Sun L., Kurochkin N.N., Kunetsky V.E., Mirabelli C., Neyts J., Leyssen P., Mikhailov S.N.* Fluorination of naturally occurring N^6-benzyladenosine remarkably increased its antiviral activity and selectivity. // Molecules. 2017. V. 22. № 7. P. 1219.

20. *Kline P.C., Schramm V.L.* Purine nucleoside phosphorylase. Catalytic mechanism and transition-state analysis of the arsenolysis reaction. // Biochemistry. 1993. V. 32. № 48. P. 13212–13219.

SYNTHESIS OF FLUORINE-CONTAINING ANALOGUES OF PURINE DEOXINUCLEOSIDES: OPTIMIZATION OF ENZYMATIC TRANSGLYCOSYLATION CONDITIONS

M. S. Drenichev[a], E. O. Dorinova[a], I. V. Varizhuk[a], V. E. Oslovsky[a], M. A. Varga[a], R. S. Esipov[b], D. D. Lykoshin[b], and C. S. Alexeev[a,#,##]

[a] *Laboratory of Design and Synthesis of Biologically Active Compounds, Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

[b] *Laboratory of Biopharmaceutical Technologies, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: micelle@mail.ru*

[##] *e-mail: room517@eimb.ru*

Presented by Academician of the RAS S.N. Kochetkov

In this work, a comparative analysis of the conditions of transglycosylation reactions catalyzed by *E. Coli* nucleoside phosphorylases was carried out, and the optimal conditions for the formation of various nucleosides were determined. Under the optimized conditions of transglycosylation reaction, fluorine-containing derivatives of N^6-benzyl-2'-deoxyadenosine, potential inhibitors of replication of enteroviruses in a cell, were obtained starting from the corresponding ribonucleosides.

Keywords: adenosine, 7-methylguanosine, nucleoside phosphorylase (NP), enzymes, transglycosylation, fluorine-containing derivatives, benzyladenine

EDN: NQGONI
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 152–160

УДК 577.115.3: 593.9(265.72)

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИГЛОКОЖИХ ЗАЛИВА НЯЧАНГ (ЮЖНО-КИТАЙСКОЕ МОРЕ)

© 2022 г. Е. С. Обухова[1,2,*], А. М. Рожина[2], В. П. Воронин[1], П. Ю. Дгебуадзе[3], С. А. Мурзина[1,]**

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым
Поступило 22.10.2021 г.
После доработки 01.12.2021 г.
Принято к публикации 01.12.2021 г.

Представлены результаты изучения антимикробной активности липидных экстрактов тканей морских звезд *Linckia laevigata* и *Culcita novaeguineae* и морского ежа *Diadema setosum* залива Нячанг (Южно-Китайское море) в отношении нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* sp., *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*. Определено действие исследуемых экстрактов на грамположительные, грамотрицательные микроорганизмы, а также дрожжеподобные грибы рода *Candida*. Установлено, что липидные экстракты иглокожих залива Нячанг обладают наибольшей антимикробной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов, а именно – *Streptococcus pyogenes*.

Ключевые слова: антимикробная активность, нозокомиальные штаммы, липиды, жирные кислоты, тропические экосистемы

DOI: 10.31857/S2686738922020160

Открытие антибиотиков ознаменовало новую эру в медицине, однако спустя десятилетия бактериальные инфекции остаются глобальной угрозой для здравоохранения, ввиду увеличивающейся антибиотикорезистентности микроорганизмов [1, 2], поэтому необходим поиск новых биологически активных соединений, обладающих антимикробными свойствами [3].

Наряду с перспективностью изучения антимикробных пептидов, механизм действия которых связан с нарушением структуры бактериальной плазматической мембраны [4], в качестве потенциальных антимикробных агентов в настоящее время рассматриваются вещества липидной природы. Помимо хорошо известной значимости полиненасыщенных жирных кислот омега-3 (ω-3 ПНЖК) для питания и здоровья человека, для этой группы соединений установлена противовоспалительная и антиоксидантная активность [5]. Механизмы антибактериальных свойств ПНЖК определяются их воздействием на цитоплазматическую и наружную мембраны бактериальных клеток и включают нарушение цепи переноса электронов, разобщение окислительного фосфорилирования, ингибирование активности ферментов, нарушение транспорта питательных веществ и перекисное окисление, впоследствии приводящие к гибели бактериальной клетки [6].

Альтернативными и сравнительно безопасными источниками “морских” липидов, перспективных с точки зрения их антибактериальной активности, могут выступать иглокожие, широко распространенные в тропических экосистемах, многие из которых являются популярными объектами аквакультуры региона Индо-Вест Пацифики.

В настоящей работе изучена антимикробная активность липидных экстрактов тканей (печень и гонады) морских звезд – *Linckia laevigata* (Linnaeus, 1758) и *Culcita novaeguineae* Müller & Troschel, 1842, а также морского ежа *Diadema setosum* (Leske, 1778) – массово встречающихся видов в заливе Нячанг (Южно-Китайское море).

Выделение общих липидов из тканей исследуемых видов иглокожих: *L. laevigata* и *C. novaeguineae* – печень ($n = 15$), *D. setosum* ($n = 15$) проводили методом Дж. Фолча [7]. Анализ отдельных липидных

[1]*Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия*
[2]*Петрозаводский государственный университет, Медицинский институт, Петрозаводск, Россия*
[3]*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия*
**e-mail: Obyhova_elena@mail.ru*
***e-mail: murzina.svetlana@gmail.com*

Таблица 1. Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам

Микроорганизм	Профиль чувствительности к антибиотикам	Профиль резистентности к антибиотикам
E. coli	ЦОС, ЛЕВ, АС, CZA	ЦРО, ЦТК, ЦПМ, ЦИП, ЦФЛ, ЦОМ, АМП, ПИП, ЦАЗ, АТМ, ТС, АКК
Kl. pneumoniae	МПН, ИМ, CZA	ГЕН, АН, ЦРО, ЦТК, ЦПМ, ЦИП, ЦОС, ЦФЛ, ЦОМ, АМП, ПИП, ЛЕВ, ЦАЗ, АТМ, ТС, АКК, АС
Candida sp.	ФКН, АМВ, КСА, MCL	
Ps. aeruginosa		ЦПМ, ЦАЗ, CZA, ИМ, МПН, АТМ, ЦИП, АН
S. aureus	ОКС, ЛЗД, ЦОС, ЦИП, АН, ТС	ПЕН, ЛЕВ
Str. pyogenes	ПЕН, ВА, ТС, ЛЗД	ЛЕВ, ЭРИ
E. faecalis	АМП, ВА, ИМ	ЛЗД

Примечание: АМВ – Амфотерицин В, КСА – Кетоконазол, MCL – Миконазол, ГЕН – Гентамицин, МПН – Меропенем, ИМ – Имипенем, АН – Амикацин, ЦРО – Цефтриаксон, ЦТК-Цефотаксим, ЦПМ – Цефепим, ЦИП – Ципрофлоксацин, ЦОС – Цефокситин, ЦФЛ – Цефалексин, ЦОМ – Цефуроксим, АМП – Ампициллин, ПИП – Пиперациллин, ЛЕВ – Левомицитин, ЦАЗ – Цефтазидим, АТМ – Азтреонам, ТС – Триметоприм/сульфометоксазол, АКК – Амоксициллин/клавулановая кислота, АС – Ампициллин/сульбактам, CZA – Цефтазидим/авибактам, ЛЗД – Линезолид, ОКС – Оксациллин, ПЕН – Бензилпенициллин, ФКН – Флуконазол, ВА – Ванкомицин, ЭРИ – Эритромицин.

классов проводили методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ), индивидуальные фракции фосфолипидов анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также проведено полное жирнокислотное профилирование общих липидов методом газовой хроматографии (ГХ) [8]. В исследовании использовано научное оборудование ЦКП КарНЦ РАН. Полученные данные о составе липидов и жирных кислот исследуемых тканей сопоставляли с результатами антимикробной активности. Для чего после удаления хлороформ-метанольной смеси к липидным экстрактам добавляли диметилсульфоксид (ДМСО) в концентрациях 30, 50 и 90%. Разные концентрации ДМСО были взяты в связи с тем, что ДМСО является антимикробным агентом и в медицинской практике используется для лечения инфекционных заболеваний в разных концентрациях в зависимости от типа инфекции. ДМСО добавляли к экстрактам для создания эмульсии, которая позволяет капельно наносить экстракты на чашки Петри с микроорганизмами.

Скрининг противомикробной активности липидных экстрактов исследуемых тканей иглокожих осуществляли в отношении нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus, Candida* sp., выделенных из многопрофильного стационара г. Петрозаводска. Исследуемым материалом для выделения культур служили раневое отделяемое (*E. coli, E. faecalis*), моча (*Str. pyogenes, Ps. aeruginosa*), мокрота (*Kl. pneumoniae*, *Candida sp.*, *S. aureus*). В отношении всех изолированных микроорганизмов предварительно была определена чувствительность к антимикробным препаратам в соответствии со стандартными методиками (табл. 1).

Для приготовления инокулюма использовали суточные культуры бактерий, выросшие на плотной питательной среде, которые суспендировали в стерильном физиологическом растворе до получения микробной взвеси плотностью 0.5 по стандарту МакФарланда. Бактериальную суспензию стерильным ватным тампоном сеяли газоном на агар Мюллер-Хинтона.

Засеянную микроорганизмами чашку Петри делили на 6 секторов, в 5 секторов вносили по

Таблица 2. Содержание общих липидов и липидных классов (фосфолипиды, триацилглицерины, диацилглицерины, эфиры холестерина, холестерин, свободные жирные кислоты) (% сухого вещества) в исследованных тканях некоторых видов иглокожих (*Linckia laevigata*, *Diadema setosum*, *Culcita novaeguineae*)

Вид	*Linckia laevigata*	*Diadema setosum*	*Culcita novaeguineae*
n	15	15	15
ОЛ	14.20 ± 0.90	24.98 ± 1.02	13.80 ± 0.53
ФЛ	3.26 ± 0.26	3.38 ± 0.21	3.10 ± 0.12
МАГ	1.35 ± 0.11	1.42 ± 0.14	1.36 ± 0.04
ДАГ	0.40 ± 0.03	3.18 ± 0.26	0.51 ± 0.06
ХС	3.37 ± 0.24	4.21 ± 0.23	3.53 ± 0.10
СЖК	3.80 ± 0.31	5.53 ± 0.46	3.26 ± 0.23
ТАГ	0.31 ± 0.09	5.87 ± 1.12	0.75 ± 0.15
ЭХС	1.70 ± 0.14	1.38 ± 0.19	1.29 ± 0.05

Примечание: ОЛ – общие липиды, ФЛ – фосфолипиды, ТАГ – триацилглицерины, ДАГ – диацилглицерины, МАГ – моноацилглицерины, ЭХС – эфиры холестерина, ХС – холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты.

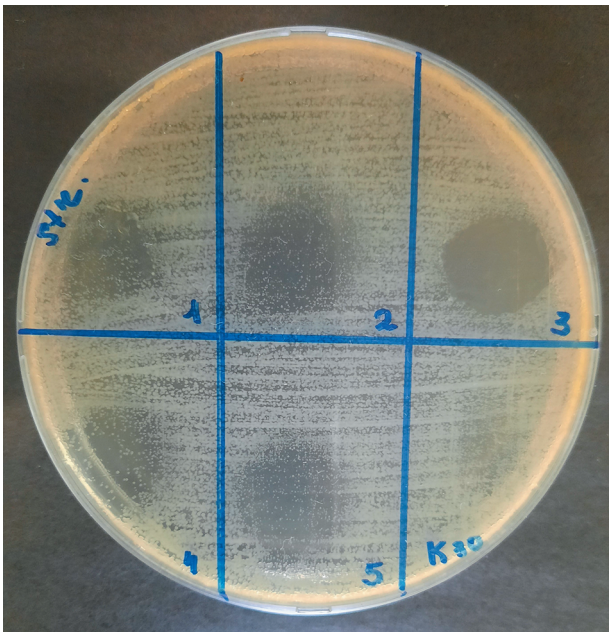


Рис. 1. Действие некоторых липидных экстрактов *Culcita novaeguineae* на *S. pyogenes*.

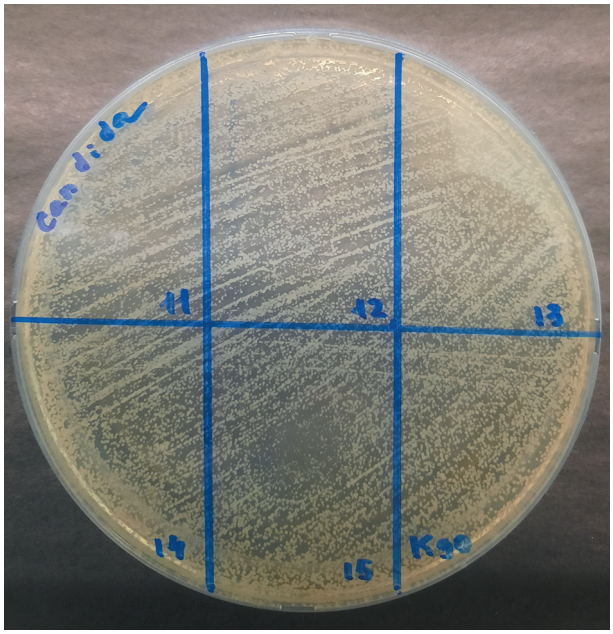


Рис. 2. Действие некоторых липидных экстрактов *Culcita novaeguineae* на *Candida* sp.

50 мкл липидных экстрактов, которые предварительно были растворены в ДМСО 30, 50 или 90% концентрации, в 6-й сектор вносили только ДМСО 30, 50 или 90% концентрации, соответственно, в качестве контроля. Посевы инкубировали при 37° С в течение 24 ч, *Candida sp.* – 48 ч.

Зону задержки роста определяли визуально по следующей шкале: “–” – отсутствие действия, зона задержки роста отсутствует; “+” – бактериостатическое действие, отмечается подавление роста; “++” – неполное бактерицидное действие, отмечается подавление роста, визуализируются

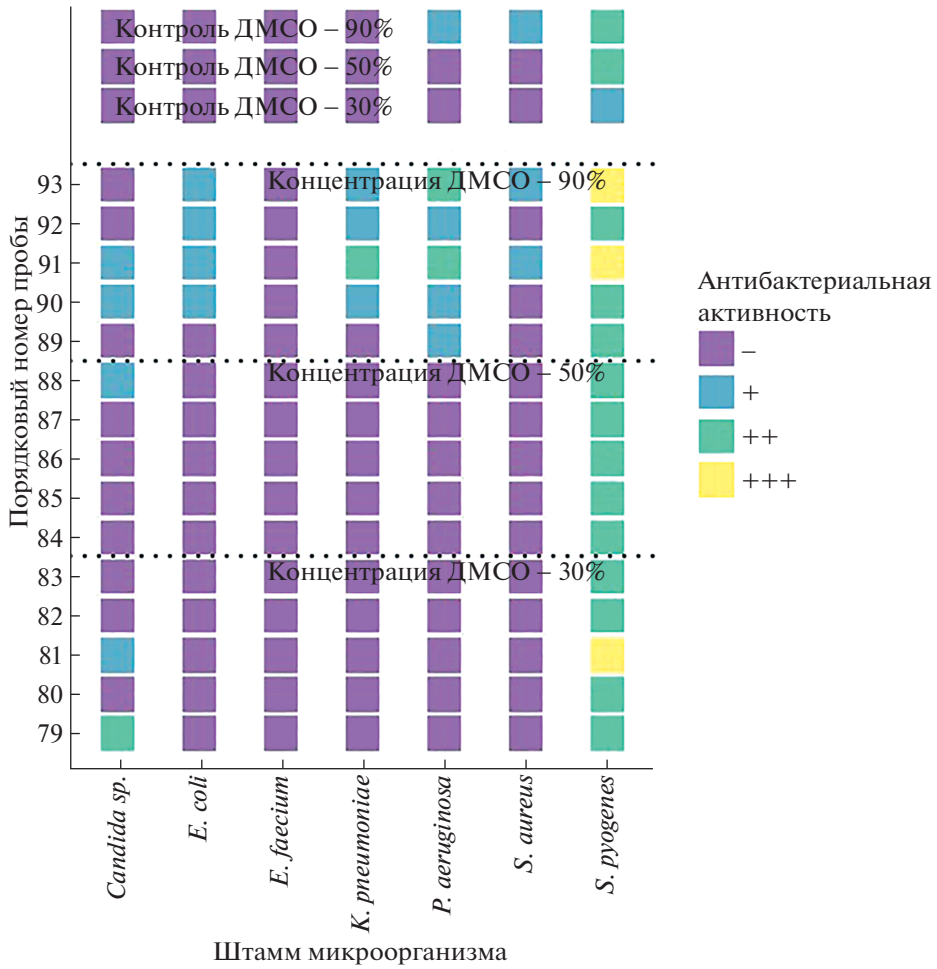


Рис. 3. Антимикробная активность липидных экстрактов *Culcita novaeguineae.*

единичные колонии; “+++” – полное бактерицидное действие, полное подавление роста. На рис. 1, 2 представлены результаты качественного эксперимента, построенного по принципу наличия/отсутствия эффекта бактерицидного действия. Каждая проба была нанесена в 3-повторностях, полученный результат посева оценен по “шкале бактериостатического действия” по сравнению с контрольной пробой и усреднен. Для каждого штамма микроорганизма был проведен частотный анализ для выявления максимальной антимикробной активности при разных концентрациях ДМСО в липидных экстрактах иглокожих. В ходе эксперимента было обследовано 189 чашек Петри.

Установлено, что липидные экстракты иглокожих залива Нячанг проявляют наибольшее антимикробное действие в отношении *S. pyogenes* (рис. 3–5). Так, на рис. 3 показано, что липидные экстракты морской звезды *C. novaeguineae* образец № 81 (совместно с ДМСО в концентрации 30%) и образцы № 91 и № 93 (концентрация ДМСО 90%) проявляли полное бактерицидное действие в отношении *S. pyogenes*, в то время как в контроле отмечали бактериостатическое действие раствора ДМСО 30% и неполное бактерицидное действие раствора ДМСО 90%. Действие экстрактов иглокожих *D. setosum* и *L. laevigata* в концентрации ДМСО 30% на изучаемый микроорганизм варьировало от неполного до полного бактерицидного эффекта, в то время как в контроле фиксировали либо отсутствие, либо бактериостатическое действие образцов (рис. 4, 5). Ряд экстрактов *D. setosum* в концентрациях ДМСО 30 и 50% бактериостатически действовал на изоляты *S. aureus* и *Candida* sp. при отсутствии действия в контрольных пробах (рис. 4). При изучении антибактериального действия липидных экстрактов на грамотрицательные микроорганизмы *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. aeruginosa* обнаружен бактериостатический и неполный бактерицидный эффект некоторых экстрактов *C. novaeguineae* в концентрации ДМСО 90%, в то время как в контрольных пробах фиксировали отсутствие действия (рис. 3). Экс-

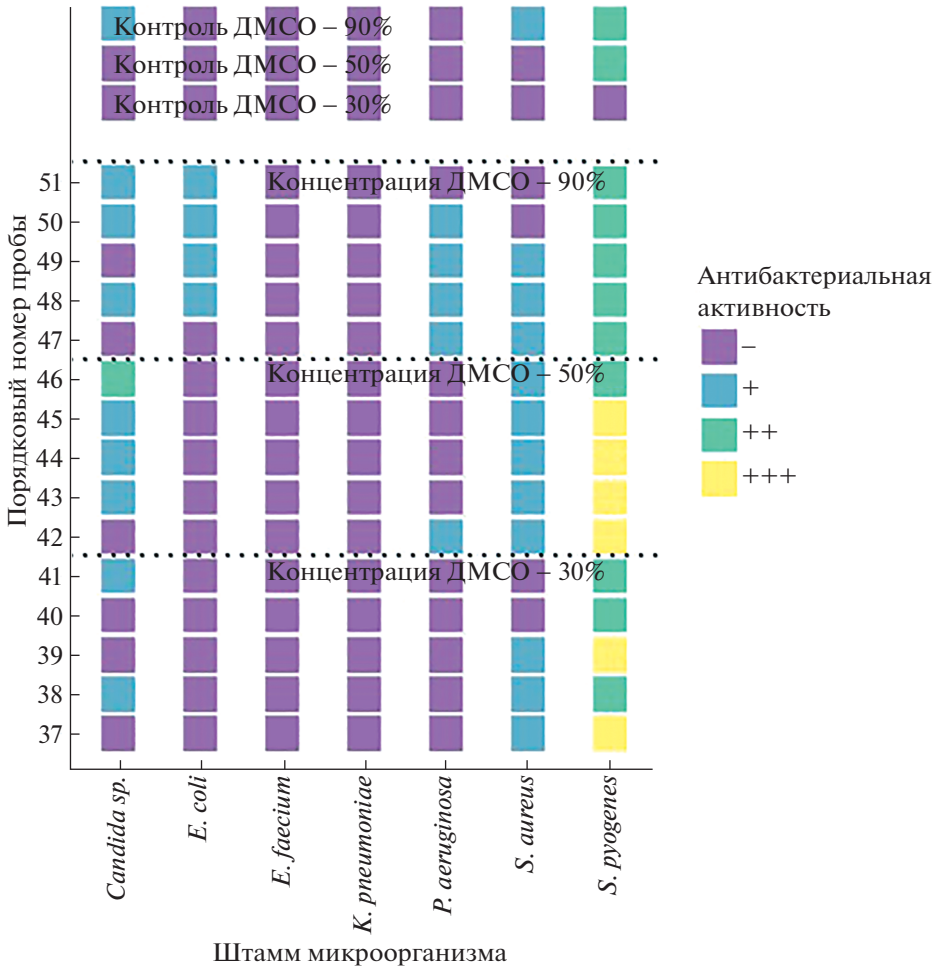


Рис. 4. Антимикробная активность липидных экстрактов *Diadema setosum*.

тракты *D. setosum* бактериостатически действовали на *P. aeruginosa* и *E. coli* при концентрации ДМСО 90% (рис. 4) аналогичное действие на *P. aeruginosa* установлено для липидных экстрактов морской звезды *L. laevigata* (рис. 5). В отношении *E. faecium* антимикробное действие липидных экстрактов *L. laevigata*, *D. setosum* и *C. novaeguineae* не установлено (рис. 3–5).

Исследованные виды иглокожих различались содержанием общих липидов (ОЛ) и количественным составом липидных классов (табл. 2). Так, наибольшее количество ОЛ показано для морского ежа *D. setosum* (25% сухого вещества) за счет, преимущественно, неполярных липидов – триацилглицеринов (5.87%), которые, как известно, практически не проявляют антимикробного действия. Для морских звезд *L. laevigata* и *C. novaeguineae* содержание ОЛ составило 14.2 и 13.8% соответственно. Доминирующими классами липидов у морских звезд являлись свободные жирные кислоты, фосфолипиды и холестерин, антимикробные свойства которых достаточно выражены. Так, свободные жирные кислоты участвуют в метаболических процессах, приводящих к подавлению передачи сигналов от клетки к клетке, препятствуя их адгезии и формированию бактериальной пленки [9]. Жирнокислотный профиль общих липидов морских звезд характеризовался доминированием полиненасыщенных ЖК, ПНЖК, (45% суммы ЖК – *C. novaeguineae* и 52% – *L. laevigata*) за счет превалирования n-6ПНЖК (20 и 16% соответственно), в которых основной являлась арахидоновая ЖК, 20:4(n-6), содержание мононенасыщенных ЖК, МНЖК, варьировало от 30 до 34% за счет 20:1(n-11), 18:1(n-9), 18:1(n-7), количество насыщенных ЖК, НЖК составило от 18 до 21% с доминированием 18:0, 16:0 и 20:0. Обнаружено, что ЖК-профиль морского ежа отличался от такового у морских звезд доминированием НЖК (42% суммы ЖК) за счет 16: 0 и 14:0 (24 и 8% соответственно), затем в количественном отношении следовали ПНЖК (31.5%), где n-6ПНЖК составляли 18% за счет 20: 4(n-6), содержание МНЖК – 26% за счет

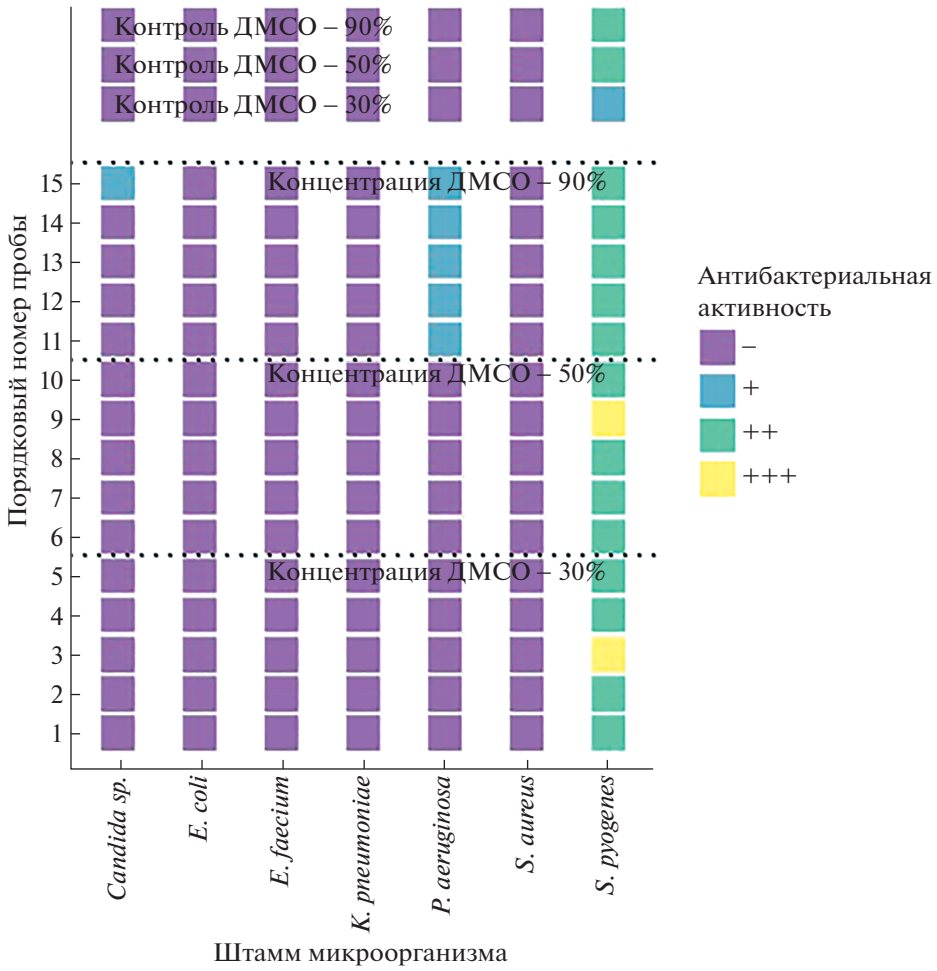


Рис. 5. Антимикробная активность липидных экстрактов *Linckia laevigata*.

доминирования 16: 1(n-7) (табл. 3). Имеются сведения о том, что ненасыщенные ЖК в большей степени активны в отношении грамположительных бактерий и антимикробные свойства ЖК повышаются с увеличением их ненасыщенности и связаны с положением двойной связи [10]. Следует упомянуть, что выраженные антимикробные свойства арахидоновой кислоты и ее производных – эйкозаноидов, а также эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, выделенных из разных источников, хорошо известны, при этом механизм их действия достаточно широк и многофакторен [11].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что липидные экстракты иглокожих залива Нячанг обладают наибольшей антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий, а именно – *S. pyogenes*.

Показано, что исследуемые гидробионты различались как качественным, так и количественным составом липидов и жирных кислот, при этом проявляя схожее противомикробное действие. Так, липидный профиль морских звезд был схож и характеризовался исключительным доминированием ФЛ, ХС и СЖК, далее следовали ЭХС и МАГ, минорными классами являлись ТАГ и ДАГ. Другой состав липидов отличал морского ежа, который характеризовался доминированием ТАГ, СЖК, затем следовал ХС, далее общие ФЛ и меньше всего было МАГ и ЭХС. При этом количественные различия по содержанию исследованных липидов у морского ежа более ровные по сравнению с морскими звездами: количество ФЛ, ХС и СЖК в 2.8 раза выше, чем ЭХС и МАГ. Установленное антимикробное действие исследованных видов морских звезд, вероятно, обусловлено повышенным содержанием свободных жирных кислот и фосфолипидов, а также ПНЖК (от 45 до 52% суммы ЖК), в частности “омега-6” ПНЖК, которые доминировали в ЖК-профиле этих гидробионтов.

Интересно, что при изучении антибактериального действия экстрактов морского ежа установ-

Таблица 3. Жирнокислотный состав (% от суммы) в исследованных тканях некоторых видов иглокожих (*Linckia laevigata*, *Diadema setosum*, *Culcita novaeguineae*)

Вид	*Linckia laevigata*	*Diadema setosum*	*Culcita novaeguineae*
n	5	5	5
14:0	0.65 ± 0.09	8.43 ± 1.10	0.46 ± 0.04
16:0	3.82 ± 0.16	24.33 ± 0.69	4.30 ± 0.64
17:0	1.05 ± 0.07	0.95 ± 0.14	0.87 ± 0.07
18:0	8.27 ± 0.13	5.02 ± 0.13	10.10 ± 1.04
20:0	2.67 ± 0.27	1.93 ± 0.10	3.37 ± 0.29
Σ НЖК	18.01 ± 0.30	42.12 ± 1.03	21.25 ± 2.15
18:1(n-9)	8.72 ± 0.47	3.56 ± 0.78	5.23 ± 0.72
18:1(n-7)	3.46 ± 0.07	3.61 ± 0.16	4.49 ± 0.47
20:1(n-11)	10.49 ± 0.39	3.08 ± 0.21	10.73 ± 0.43
20:1(n-9)	0.62 ± 0.06	3.62 ± 0.22	1.19 ± 0.16
Σ МНЖК	29.98 ± 0.72	26.35 ± 0.72	33.67 ± 3.20
14:2(n-9)	0.65 ± 0.09	0.47 ± 0.05	0.30 ± 0.04
16:2(n-9)	0.73 ± 0.05	0.36 ± 0.02	0.40 ± 0.07
18:2(n-9)	0	0	1.27 ± 0.31
20:3(n-9)	6.16 ± 0.51	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.04
Σ (n-9)ПНЖК	8.03 ± 0.42	1.32 ± 0.07	2.61 ± 0.50
18:2(n-7)	4.15 ± 0.22	0.06 ± 0.01	0.39 ± 0.14
Σ (n-7)ПНЖК	4.95 ± 0.22	0.36 ± 0.01	0.97 ± 0.20
18:2(n-6)	1.10 ± 0.10	1.79 ± 0.12	0.67 ± 0.08
20:4(n-6)	12.93 ± 0.88	12.28 ± 0.29	17.90 ± 1.46
Σ (n-6)ПНЖК	15.91 ± 0.90	18.10 ± 0.63	19.98 ± 1.37
18:2(n-4)	6.68 ± 0.39	0.11 ± 0.02	0.70 ± 0.21
18:3(n-4)	1.52 ± 0.69	0.04 ± 0.02	2.21 ± 0.30
Σ (n-4)ПНЖК	10.45 ± 0.89	0.86 ± 0.13	6.24 ± 0.51
18:3(n-3)	0	0.89 ± 0.08	0.73 ± 0.27
18:4(n-3)	2.48 ± 0.20	1.73 ± 0.17	0
20:5(n-3)	6.24 ± 0.15	5.01 ± 0.30	8.76 ± 0.70
22:5(n-3)	0.45 ± 0.21	0.27 ± 0.02	0.88 ± 0.54
22:6(n-3)	0.83 ± 0.04	1.25 ± 0.05	1.35 ± 0.51
Σ (n-3)ПНЖК	12.67 ± 0.19	10.85 ± 0.51	14.78 ± 0.97
Σ ПНЖК	52.01 ± 0.53	31.5 ± 0.73	45.08 ± 1.23

Примечание: в таблице представлены отдельные жирные кислоты, доминирующие в семействе ЖК или составляющие более 1%. НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

лено его действие на *S. pyogenes,* при этом доминирующими классами липидов являлись ТАГ и метаболически лабильными СЖК, что превышает таковое у морских звезд. Жирнокислотный профиль общих липидов отличался доминированием НЖК (42% суммы ЖК) за счет пальмитиновой кислоты, 16: 0, антимикробные свойства которой широко известны [12], далее следовали в значимом количестве ПНЖК (31.5% суммы ЖК), в которых также доминировали (n-6) ПНЖК.

Согласно современным представлениям ПНЖК оказывают значимое антимикробное действие на многие организмы, включая бактерии, вирусы, грибы и некоторые паразиты. При этом есть данные, что ПНЖК обладают также иммуномодулирующим действием в отношении организма человека и способны усиливать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ [11].

Свободные жирные кислоты также принимают участие в формировании противоопухолевого иммунитета за счет увеличения продукции свободных радикалов в опухолевых клетках [13]. Кроме того, в других исследованиях было выявлено, что жирные кислоты оказывают противо-

воспалительный и ранозаживляющий эффект [14–16].

Антибактериальные и иммуномодулирующие свойства ПНЖК, содержащихся в липидных экстрактах иглокожих, делают их перспективными объектами для создания антимикробных средств для лечения инфекций разной локализации. При этом вероятным способом применения подобных средств будет являться наружный способ ввиду возможных процессов биотрансформации экстрактов при инъекционном или пероральном применении. В работе Л.Ю. Лаженцевой представлены результаты клинических испытаний нового антимикробного препарата из липидов морских рыб в качестве наружного антисептика в комплексной терапии местных гнойно-воспалительнх заболеваний кожи, мягких тканей и слизистых оболочек, показана эффективность препарата при гнойно-воспалительных раневых процессах, урогенитальных заболеваниях и микробной экземе [17].

Результаты исследования антимикробной активности иглокожих залива Нячанг представляют интерес с точки зрения изучения механизмов действия данных экстрактов, а также поиска различных композиций липидов и их жирнокислотных компонентов, обладающих антибактериальным действием, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках ГЗ КарНЦ РАН № 0218-2019-0076 (№ г.р. АААА-А19-119080990014-0).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hiltunen T., Virta M., Laine A.L.* Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological. 2017. V. 372. № 1712. P. 1–7.
2. *Данилов А.И., Жаркова Л.П.* Антибиотикорезистентность: аргументы и факты // Клиническая фармакология и терапия. 2017. Т. 26. № 5. С. 6–9.
3. *Reygaert W.C.* An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria //AIMS Microbiology. 2018. V. 4. № 3. P. 482–501.
4. *Mwangi J., Hao X., Lai R., et al.* Antimicrobial peptides: new hope in the war against multidrug resistance // Zoological Research. 2019. V. 40. № 6. P. 488–505.
5. *Coraça-Huber D.C., Steixner S., Wurm A., et al.* Antibacterial and Anti-Biofilm Activity of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids against Periprosthetic Joint Infections-Isolated Multi-Drug Resistant Strains // Biomedicines. 2021.V. 9. № 4. P. 334.
6. *Desbois A.P., Smith V.J.* Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential // Appl Microbiol Biotechnol. 2010. V. 85. № 6. P. 1629–1642.
7. *Folch J., Lees M., Sloan-Syanley G.H.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
8. *Nemova N.N., Nefedova Z.A., Pekkoeva S.N., et al.* The Effect of the Photoperiod on the Fatty Acid Profile and Weight in Hatchery-Reared Underyearlings and Yearlings of Atlantic Salmon Salmo salar L. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 6. P. 845.
9. *Inguglia L., Chiaramonte M., Di Stefano V., et al. Salmo salar* fish waste oil: fatty acids composition and antibacterial activity // PeerJ. 2020. V. 8. P. 9299.
10. *Рыбин В.Г., Блинова Ю.Г.* Антимикробные свойства липидов // Известия Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра. 2001. Т. 129. С. 179–196.
11. *Das U.N.* Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: a review // Journal of Advanced Research. 2018. V. 11. P. 57–66.
12. *Casillas-Vargas G., Ocasio-Malavé C., Medina S., et al.* Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents // Prog Lipid Res. 2021. V. 82. P. 101093.
13. *Ramesh G., Das U.N.* Effect of cis-unsaturated fatty acids on Meth-A ascitic tumour cells *in vitro* and *in vivo* // Cancer Letters. 1998. V. 123. № 2. P. 207–214.
14. *Nakatsuji T., Kao M.C., Fang J.Y. et al.* Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris // J. Invest. Dermatol. 2009. V. 129. № 10. P. 2480–8.
15. *Yang H., Chen J., Rathod J. et al.* Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in a mouse infection model // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 2635.
16. *Zhang Z., Wang S., Diao Y. et al.* Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity // Lipids Health Dis. 2010. V. 9. P. 24.
17. *Лаженцева Л.Ю.* Влияние антимикробного препарата из липидов морских рыб на возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний: Дис. ... канд. биол. наук. Владивосток; 2000. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/vliyanie-antimikrobnogo-preparata-iz-lipidov-morskikh-ryb-na-vozbuditelei-gnoino-vospaliteln. Ссылка активна на 1 декабря 2021.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LIPID EXTRACTS OF ECHINODERMS IN THE NHATRANG BAY (SOUTH CHINA SEA)

E. S. Obukhova[a,b,#], A. M. Rozhina[b], V. P. Voronin[a], P. Yu. Dgebuadze[c], and S. A. Murzina[a,##]

[a] *Institute of Biology of the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation*

[b] *Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russian Federation*

[c] *Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: Obyhova_elena@mail.ru*

[##] *e-mail: murzina.svetlana@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

The obtained results on the study of the antimicrobial activity of lipid extracts of tissues of starfishes *Linckia laevigata* and *Culcita novaeguineae* and sea urchin *Diadema setosum* collected in the Nhatrang Bay (South China Sea) against nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* sp., *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* are presented. The effect of the investigated extracts on gram-positive, gram-negative microorganisms, as well as yeast of the genus *Candida*, was determined. It was found that lipid extracts of echinoderms of the Nhatrang Bay have the highest antimicrobial activity against gram-positive microorganisms, namely *Streptococcus pyogenes*.

Keywords: antimicrobial activity, nosocomial strains, lipids, fatty acids, tropical ecosystems

EDN: XOUNTY
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 161–165

УДК 577.15

РАЗРАБОТКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АЛЛОСТЕРИЧЕСКОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА С ТИРЕОИДОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2022 г. А. А. Бахтюков[1], К. В. Деркач[1], Е. А. Фокина[1], В. Н. Сорокоумов[1,2], И. О. Захарова[1], Л. В. Баюнова[1], А. О. Шпаков[1,*]

Представлено академиком РАН Л.П. Филаретовой
Поступило 15.11.2021 г.
После доработки 03.12.2021 г.
Принято к публикации 03.12.2021 г.

Для нормализации тиреоидного статуса при гипотиреозе, вызванном резистентностью к тиреотропному гормону (ТТГ), могут быть использованы низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ТТГ. Синтезировано новое соединение этил-2-(4-(4-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]-пиримидин-4-ил)фенил)-*1H*-1,2,3-триазол-1-ил) ацетат (TPY3m), которое стимулировало продукцию тироксина при введении крысам (25 мг/кг, в/б), а также повышало экспрессию тиреоидогенных генов в культуре тироцитов FRTL-5 (30 мкМ) и в щитовидной железе крыс. Обработка TPY3m *in vitro* и *in vivo* не приводила к снижению экспрессии гена рецептора ТТГ в тироцитах, восстанавливая ее в условиях гиперактивации рецептора гормоном. Этим обусловлено сохранение, а в ряде случаев и потенцирование тиреоидогенных эффектов ТТГ (FRTL-5) или тиролиберина (крысы) при их совместном введении с TPY3m. TPY3m является прототипом препарата для коррекции функций тиреоидной системы при субклиническом гипотиреозе.

Ключевые слова: рецептор тиреотропного гормона, аллостерический агонист, гипотиреоз, щитовидная железа, тиреоидный гормон

DOI: 10.31857/S2686738922020032

Основным регулятором синтеза тиреоидных гормонов – тироксина (T4) и трийодтиронина (T3) в тироцитах, специализированных клетках щитовидной железы (ЩЖ), является тиреотропный гормон (ТТГ), секретируемый аденогипофизом в ответ на стимуляцию тиролиберином, гипоталамическим ТТГ-рилизинг-гормоном (ТРГ) [1]. ТТГ специфически связывается с локализованным на поверхности тироцитов G-белок-сопряженным рецептором ТТГ, активируя аденилатциклазный и фосфолипазный пути и усиливая экспрессию и активность белков, ответственных за синтез T4 (тиреоглобулин, тиреопероксидаза, Na^+/I^-котранспортер) и его конверсию в T3 (D2-дейодиназа) [2]. В случае мутаций в эктодомене рецептора ТТГ, препятствующих его связыванию с гормоном, а также при воздействии на рецептор ТТГ инактивирующих аутоантител развивается резистентность ЩЖ к ТТГ, что ведет к субклиническому гипотиреозу [3, 4].

Одним из подходов для стимуляции рецептора ТТГ может стать применение аллостерических регуляторов с активностью полных агонистов [5, 6]. Их особенностью является способность стимулировать рецепторы гипофизарных гликопротеиновых гормонов, которые имеют инактивирующие мутации в эктодомене и потому не чувствительны к гормонам [5]. Ранее нами были разработаны пептидные аллостерические агонисты рецептора ТТГ, способные взаимодействовать с аллостерическим сайтом, сформированным цитоплазматическими петлями [7]. Однако, несмотря на активность в условиях *in vitro*, они имели ограничения в условиях *in vivo*, что было обусловлено их деградацией. Более перспективным является разработка более устойчивых гетероциклических соединений, способных проникать в аллостерический сайт, расположенный в трансмембранном домене рецептора ТТГ [5]. Нами на основе структуры тиено[2,3-d]-пиримиди-

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*
[2]*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет", Санкт-Петербург, Россия*
**e-mail: alex_shpakov@list.ru*

на было разработано соединение TP48 с активностью аллостерического антагониста рецептора ТТГ, которое может быть использовано для нормализации тиреоидного статуса при аутоиммунном гипертиреозе [8]. Целью настоящего исследования было создать лиганд аллостерического сайта рецептора ТТГ, который, как и TP48, имеет тиено[2,3-d]-пиримидиновую структуру, но в отличие от него активирует рецептор ТТГ. Была поставлена задача изучить его влияние на генную экспрессию тироидогенных белков и рецептора ТТГ в культуре тироцитов и в условиях *in vivo* исследовать его влияние на базовый и стимулированный ТРГ тиреоидогенез у крыс.

Для синтеза этил-2-(4-(4-(5-амино-6-(*трет*-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]-пиримидин-4-ил)фенил)-*1H*-1,2,3-триазол-1-ил) ацетата (TPY3m) использовали реакцию между 5-амино-*N*-(*трет*-бутил)-4-(4-этинилфенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]-пиримидин-6-карбоксамидом и этил-2-азидоуксусной кислотой в присутствии медь-содержащих катализаторов. После очистки с помощью ВЭЖХ полученный продукт ($T_{пл.}$ 218.1–218.6°C) был охарактеризован с помощью ^{1}H-ЯМР ("Bruker Avance III 400", Германия) и масс-спектрометрии ("Bruker micrOTOF", Германия). Спектр ^{1}H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*): δ 8.09–8.03 (m, 3H Ar phenyl + Ar triazol), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H Ar phenyl), 5.32 (s, 2H CArC$\underline{H_2}$C(O)), 5.26 (m, 3H NH_2 + NH), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H CH_2 C(O)O$\underline{Et}$), 2.69 (s, 3H MeS), 1.48 (s, 9H tBu), 1.36 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H CH_3 C(O)O$\underline{Et}$). Масс-спектр (ESI+, 100 В, CH_3OH): найдено – 526.1695 [M+H]; рассчитано для $C_{24}H_{28}N_7O_3S_2^+$ – 526.1690.

В экспериментах использовали 3–4-месячных крыс Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к корму и воде. Клеточную линию тироцитов FRTL-5 получали из "European Collection of Authenticated Cell Cultures". Культивирование проводили в среде F-12 с добавлением 6 гормонов и ростовых факторов (F–12+6H): 1 мЕД/мл ТТГ ("Elabscience", США) 10 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл ростового фактора печени, 10 нМ гидрокортизона ("Sigma", США), 10 нг/мл соматостатина ("Tocris Bioscience", Великобритания), 5 мкг/мл трансферрина ("Биолот", Россия) [9]. Перед экспериментом клетки снимали с подложки, используя раствор трипсина-версена (1: 1), пересеивали в полную ростовую среду F–12+6H (4.3×10^4 клеток/0.25 мл среды/лунку), через 48 ч переводили в среду F–12+5H без ТТГ. Через 24 ч клетки инкубировали с 30 мкМ TPY3m, 6 мЕД/мл ТТГ или TPY3m+ТТГ. Через 6 ч оценивали экспрессию целевых генов.

В экспериментах *in vivo* TPY3m вводили крысам (25 мг/кг, в/б, в 200 мкл ДМСО). ТРГ ("Sigma", США) вводили интраназально в дозе 100 мкг/крысу, как описано ранее [10]. Контрольным крысам вместо TPY3m вводили ДМСО и вместо ТРГ физиологический раствор. ТРГ вводили через 30 мин после TPY3m. Формировали 4 группы (во всех n = 5) – контроль, группы с обработкой TPY3m, ТРГ и TPY3m+ТРГ. Образцы крови получали из хвостовой вены, используя анестезию 2%-ным раствором лидокаина, до введения и через 1.5 и 3 ч после введения ТРГ. Для определения уровней свободного (fT4) и общего (tT4) тироксина и свободного (fT3) и общего (tT3) трийодтиронина использовали наборы фирмы "Иммунотех" (Россия).

Экспрессию генов в клетках FRTL-5 и ткани ЩЖ оценивали с помощью ПЦР в реальном времени, для чего с помощью набора "Extract RNA" выделяли тотальную РНК, а обратную транскрипцию проводили с помощью набора "MMLV RT Kit" ("Евроген", Россия). Смесь для амплификации содержала 10 нг ПЦР-продукта, по 0.4 мкМ прямого и обратного праймеров, а также реагент qPCRmix-HS SYBR+LowROX ("Евроген", Россия). Детекцию сигнала осуществляли с помощью амплификатора "7500 Real-Time PCR System" ("Thermo Fisher Scientific Inc.", США). Данные рассчитывали методом delta-delta C_t, используя в качестве референсных генов *18S rRNA* (18S-рРНК) и *Actb* (β-актин). Анализировали экспрессию тиреоглобулина (*Tg*), тиреопероксидазы (*TPO*), Na^+/I^-котранспортера (*Nis*), D2-дейодиназы (*Dio2*) и рецептора ТТГ (*TshR*).

Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы "Microsoft Office Excel 2007", нормальность распределения проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения 4 групп – дисперсионный анализ с поправкой Тьюки. Данные представляли как $M \pm SEM$, значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Добавление ТТГ и TPY3m в инкубационную среду после 24-часовой ТТГ-депривации приводило к повышению экспрессии гена *Nis* в клетках FRTL-5, причем эффект ТТГ был более выражен (рис. 1). ТТГ также повышал экспрессию гена *Tg* (рис. 1). При совместном воздействии отмечали усиление стимулирующего эффекта ТТГ на экспрессию гена *Tg* и сохранение эффекта гормона на экспрессию гена *Nis* (рис. 1). Тем самым TPY3m проявляет свойства агониста рецептора ТТГ и не препятствует эффектам ТТГ. Последнее обусловлено различной локализацией ортостерического сайта, с которым связывается ТТГ (эктодомен), и аллостерического сайта, с которым связываются низкомолекулярные регуляторы рецептора (трансмембранный домен) [11]. TPY3m слабо влиял на экспрессию *TshR*. ТТГ ее снижал,

что является результатом компенсаторного ответа клеток на ТТГ-индуцированную гиперактивацию рецептора и ранее было показано Saji M. et al. [12]. При совместном воздействии отмечали частичное восстановление экспрессии гена рецептора ТТГ (рис. 1).

Внутрибрюшинное введение крысам TPY3m через 2 ч повышало уровень tT4, в то время как через 3.5 ч повышались уровни обоих форм T4 (табл. 1). ТРГ был активнее и через 3 ч повышал уровни всех тиреоидных гормонов (табл. 1).

При совместном введении ТРГ и TPY3m стимуляция продукции тиреоидных гормонов повышалась. Через 3.5 ч повышение уровня обеих форм T3 было большим, чем сумма приростов при введении ТРГ или TPY3m, что может указывать на потенцирующий эффект TPY3m на ТРГ-индуцированную стимуляцию продукции fT3 и tT3 (табл. 1). Содержание общего и свободного T4 при совместном введении ТРГ или TPY3m было выше, чем при их раздельном введении, но потенцирующего эффекта в этом случае выявлено не было (табл. 1). Таким образом, по способности стимулировать продукцию тиреоидных гормонов у крыс TPY3m может быть отнесен к аллостерическим агонистам рецептора ТТГ.

Исследование генной экспрессии в ЩЖ показало, что ТРГ повышает экспрессию генов *Tg*, *TPO* и *Dio2* и снижает экспрессию гена рецептора ТТГ (рис. 2). TPY3m повышал экспрессию генов *TPO* и *Dio2*. При этом экспрессия гена *TshR* в группе с обработкой TPY3m не только не снижалась, но даже повышалась, хотя различия с контролем не были значимыми (рис. 2). Необходимо отметить, что тиено[2,3-d]-пиримидины с активностью агонистов рецептора лютеинизирующего гормона, родственного рецептору ТТГ, также слабо влияют на экспрессию своего рецептора [13]. В условиях совместного воздействия стимулирующие эффекты ТРГ на экспрессию тиреоидогенных генов сохранялись, а в случае гена *Nis* эффект ТРГ усиливался (рис. 2). Наряду с этим исчезал ингибирующий эффект ТРГ на экспрессию гена *TshR* (рис. 2). Мы полагаем, что восстановление экспрессии *TshR* в группе TPY3m+ТРГ

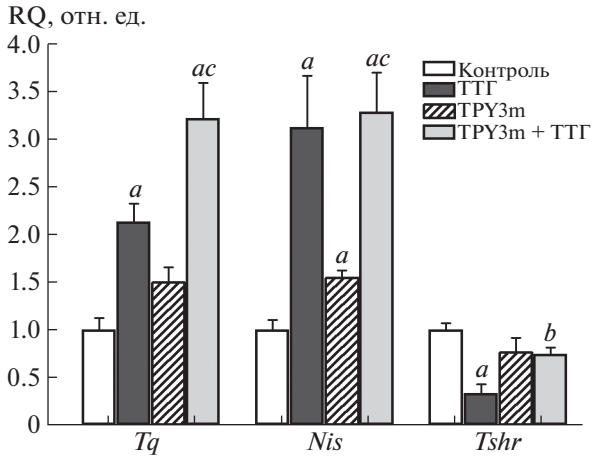


Рис. 1. Эффекты ТТГ и TPY3m на экспрессию генов тиреоглобулина (*Tg*), Na^+/I^--котранспортера (*Nis*) и рецептора ТТГ (*TshR*) в культуре тироцитов FRTL-5, предварительно инкубированных в среде без ТТГ. К – контроль, ТТГ, TPY3m и TPY3m+ТТГ – клетки, инкубированные с ТТГ (6 мЕД/мл), TPY3m (30 мкМ) и совместно ТТГ и TPY3m. Различия с К (*a*), с ТТГ (*b*) и между TPY3m и TPY3m+ТТГ (*c*) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 5$.

Таблица 1. Стимулирующие эффекты тиролиберина и TPY3m совместно и по раздельности на уровни тиреоидных гормонов в крови крыс

Группа	fT4, пМ	tT4, нМ	fT3, пМ	tT3, нМ
Через 2 ч после введения TPY3m и через 1.5 ч после введения ТРГ				
Контроль	24.32 ± 1.51	47.86 ± 1.64	2.37 ± 0.13	2.59 ± 0.15
ТРГ	37.04 ± 0.75 [a]	68.66 ± 3.16 [a]	3.77 ± 0.21 [a]	3.23 ± 0.35
TPY3m	28.26 ± 1.54 [b]	55.54 ± 1.39 [a,b]	2.78 ± 0.14 [b]	2.89 ± 0.10
TPY3m+ТРГ	38.02 ± 0.97 [a,c]	75.48 ± 1.72 [a,c]	4.02 ± 0.16 [a,c]	3.34 ± 0.21
Через 3.5 ч после введения TPY3m и через 3 ч после введения ТРГ				
Контроль	23.00 ± 0.55	46.30 ± 1.04	2.28 ± 0.12	2.35 ± 0.11
ТРГ	33.06 ± 1.30 [a]	69.02 ± 1.29 [a]	3.30 ± 0.19 [a]	3.02 ± 0.13 [a]
TPY3m	28.76 ± 0.67 [a,b]	57.50 ± 3.08 [a,b]	2.82 ± 0.13	2.75 ± 0.17
TPY3m+ТРГ	39.04 ± 0.67 [a,b,c]	81.10 ± 1.31 [a,b,c]	4.94 ± 0.24 [a,b,c]	3.69 ± 0.13 [a,b,c]

Примечание. TPY3m (группы TPY3m и TPY3m+ТРГ) вводили в дозе 25 мг/кг (в/б), ТРГ (группы ТРГ и TPY3m+ТРГ) вводили на 30 мин позднее в дозе 100 мкг/крысу (интраназально). Различия с контролем ([a]), группой ТРГ ([b]) и между группами TPY3m и TPY3m+ТРГ ([c]) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 5$.

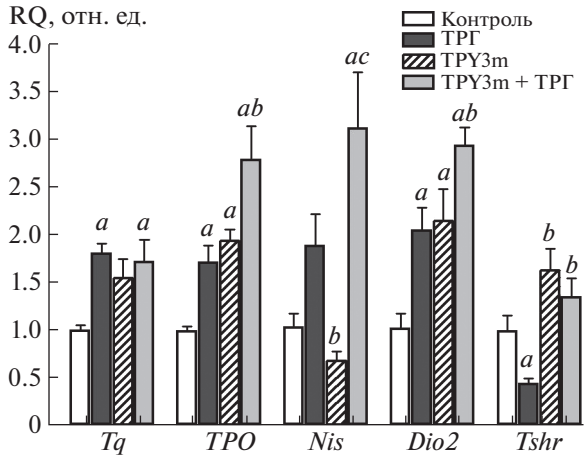


Рис. 2. Эффекты тиролиберина и TPY3m на экспрессию генов тиреоидогенных белков и рецептора ТТГ в щитовидной железе крыс. К – контроль; ТРГ, TPY3m и TPY3m+ТРГ – группы крыс, обработанные ТРГ (100 мкг/крысу, интраназально), TPY3m (25 мг/кг, в/б) и совместно ТРГ и TPY3m. Различия с контролем (*a*), группой ТРГ (*b*) и между группами TPY3m и TPY3m+ТРГ (*c*) статистически значимы при $p < 0.05$. $M \pm SEM$, $n = 5$.

по сравнению с группой ТРГ обеспечивает нормализацию чувствительности тироцитов к агонистам рецептора ТТГ. Частичное восстановление экспрессии *TshR* в присутствии TPY3m было обнаружено нами и в культуре тироцитов (рис. 1). Тем самым потенцирующий эффект TPY3m на экспрессию *Tg* в культуре тироцитов FRTL-5 и на продукцию Т3 и экспрессию *Nis* в ЩЖ крыс группы TPY3m+ТРГ может быть, по крайней мере, частично, обусловлен нормализацией экспрессии рецептора ТТГ и сохранением активности ТТГ-зависимых каскадов в условиях их гиперактивации ТТГ. Однако нельзя исключить того, что TPY3m может быть наделен не только активностью агониста, но и функционировать как положительный аллостерический модулятор (PAM). Такую активность проявляет ряд лигандов аллостерического сайта G-белок-сопряженных рецепторов, обозначаемых как аго-PAM [14, 15].

Таким образом, на основе тиено[2,3-d]-пиримидиновой структуры нами разработан новый аллостерический агонист рецептора ТТГ – TPY3m, который стимулировал продукцию тироксина при его в/б введении крысам, а также стимулировал экспрессию тиреоидогенных генов в клеточной культуре тироцитов FRTL-5 и ЩЖ крыс. TPY3m не вызывал снижения экспрессии гена рецептора ТТГ, а при совместном введении с ТТГ (FRTL-5) или ТРГ (ЩЖ) ее восстанавливал. Это, как мы полагаем, обусловливает сохранение, а в ряде случаев потенцирование эффектов ТТГ (FRTL-5) или ТРГ (крысы) на тиреоидогенез. TPY3m может рассматриваться как прототип препарата для коррекции тиреоидогенной функции ЩЖ при субклиническом гипотиреозе, в том числе обусловленном резистентностью к ТТГ, а также для ускорения поглощения радиоактивного йода тироцитами при диагностике и радиотерапии рака ЩЖ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 19-75-20122). ЯМР и масс-спектрометрию осуществляли в ресурсных центрах СПбГУ “Магнитно-резонансные методы исследования” и “Методы анализа состава веществ”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными соблюдали требования Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН (Протокол № 9–1/2020 г.), Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ortiga-Carvalho T.M., Chiamolera M.I., Pazos-Moura C.C., Wondisford F.E.* // Compr. Physiol. 2016. V. 6. P. 1387–1428.
2. *Kleinau G., Worth C.L., Kreuchwig A. et al.* // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2017. V. 8. P. 86.
3. *Persani L., Calebiro D., Cordella D. et al.* // Mol. Cell. Endocrinol. 2010. V. 322. P. 72–82.
4. *Kahaly G.J., Diana T., Olivo P.D.* // Endocr. Pract. 2020. V. 26. P. 97–106.
5. *Neumann S., Gershengorn M.C.* // Ann. Endocrinol. (Paris). 2011. V. 72. P. 74–76.
6. *Krause G., Eckstein A., Schülein R.* // Eur. Thyroid J. 2020. V. 9. P. 66–77.
7. *Derkach K.V., Shpakova E.A., Titov A.M., Shpakov A.O.* // Int. J. Pept. Res. Ther. 2015. V. 21. P. 249–260.
8. *Derkach K.V., Bakhtyukov A.A., Sorokoumov V.N., Shpakov A.O.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2020. V. 491. P. 77–80.
9. *Kogai T., Endo T., Saito T. et al.* // Endocrinology. 1997. V. 138. P. 2227–2232.
10. *Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O.* // Horm. Metab. Res. 2015. V. 47. P. 916–924.
11. *Nataraja S.G., Yu H.N., Palmer S.S.* // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2015. V. 6. P. 142.
12. *Saji M., Akamizu T., Sanchez M. et al.* // Endocrinology. 1992. V. 130. P. 520–533.
13. *Bakhtyukov A.A., Derkach K.V., Gureev M.A. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 7493.
14. *Felder C.C.* // Adv. Pharmacol. 2019. V. 86. P. 1–20.
15. *Wu Y., Tong J., Ding K. et al.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1163. P. 225–251.

DEVELOPMENT OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT ALLOSTERIC AGONIST OF THYROID-STIMULATING HORMONE RECEPTOR WITH THYROIDOGENIC ACTIVITY

A. A. Bakhtyukov[a], K. V. Derkach[a], E. A. Fokina[a], V. N. Sorokoumov[a,b], I. O. Zakharova[a], L. V. Bayunova[a], and A. O. Shpakov[a,#]

[a] *I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, Russian Federation*

[b] *Institute of Chemistry, Saint Petersburg State University, St.-Petersburg, Russian Federation*

[#] *e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Presented by Academician of the RAS L.P. Filaretova

To normalize the thyroid status in hypothyroidism caused by resistance to thyroid-stimulating hormone (TSH), low-molecular-weight allosteric agonists of TSH receptor can be used. A new compound ethyl-2-(4-(4-(5-amino-6-(*tert*-butylcarbamoyl)-2-(methylthio)thieno[2,3-d]-pyrimidine-4-yl)phenyl)-*1H*-1,2,3-triazol-1-yl) acetate (TPY3m), which stimulated the production of thyroxine when administered to rats (25 mg/kg, i.p.), and also increased the expression of thyroidogenic genes in the cultured FRTL-5 thyrocytes (30 μM) and the rat thyroid gland. The *in vitro* and *in vivo* treatment with TPY3m did not lead to a decrease in the expression of the TSH receptor gene in thyrocytes, restoring it under the conditions of receptor hyperactivation by the hormone. This is due to the preservation and, in some cases, the potentiation of the thyroidogenic effects of TSH (FRTL-5) or thyroliberin (rats) when they are co-administered with TPY3m. TPY3m is a prototype drug for correcting thyroid system functions in subclinical hypothyroidism.

Keywords: receptor of thyroid stimulating hormone, allosteric agonist, hypothyroidism, thyroid gland, thyroid hormone

EDN: KSQAGM
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 166–171

УДК 577.218

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ СПЛАЙСИНГА РНК ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ГЛИОБЛАСТОМОЙ

© 2022 г. Т. Д. Ларионова[1,§], Т. Ф. Коваленко[1,§], М. И. Шахпаронов[1], М. С. Павлюков[1,*]

Представлено академиком РАН А.Г. Габибовым
Поступило 25.11.2021 г.
После доработки 13.12.2021 г.
Принято к публикации 13.12.2021 г.

Глиобластома (GBM) считается одной из наиболее агрессивных опухолей человека. Ранее нашей группой была продемонстрирована важная роль альтернативного сплайсинга РНК в регуляции фенотипа GBM. Чтобы дополнить это исследование, мы проанализировали тип сплайсинга РНК и уровни экспрессии сплайсосомных генов в большом количестве образцов опухолевой ткани и первичных культур нейросфер GBM. Мы показали, что, основываясь на экспрессии факторов сплайсинга, можно разделить пациентов на группы, характеризующиеся различной выживаемостью, а также предположить фенотип опухоли. Кроме того, мы выявили события альтернативного сплайсинга, которые могут играть важную роль в регуляции фенотипа клеток GBM. Наконец, мы впервые исследовали экспрессию сплайсосомных генов в различных частях одной и той же опухоли, а также выявили регуляторы сплайсинга, количество которых наиболее тесно связано с выживаемостью пациентов. Перечисленные выше данные подчеркивают важную роль сплайсинга пре-РНК в прогрессии GBM.

Ключевые слова: глиома, глиобластома, сплайсинг РНК, прогноз выживаемости пациентов
DOI: 10.31857/S2686738922020135

Глиобластома является наиболее распространенной первичной опухолью головного мозга у взрослых пациентов. Несмотря на громадные усилия, направленные на борьбу с этим заболеванием, существующие методы лечения глиобластом в основном носят лишь паллиативный характер и позволяют увеличить среднюю выживаемость пациентов с трех месяцев (без лечения) до двух лет (при условии максимального хирургического удаления опухоли с последующей химио- и радиотерапией) [1, 2]. Причина столь негативного исхода кроется в чрезвычайной внутри- и межопухолевой гетерогенности. Так, на основании генетических мутаций, клетки глиобластомы делят на IDH-мутантные и IDH дикого типа [3]; на основании метилирования ДНК опухоли разделяют на CIMP+ и CIMP- [4]; наконец, по уровню экспрессии генов глиобластомы могут относиться к классическому, мезенхимальному или пронейрональному фенотипам [5]. Для каждой из этих многочисленных групп характерно свое течение болезни – различная скорость роста опухоли, чувствительность к терапии и, как следствие, различная выживаемость пациентов. Таким образом, для того чтобы достичь наилучших результатов в лечении, крайне важно правильно и своевременно определить молекулярный фенотип опухоли и, исходя из этого, выбрать лекарственный препарат, который будет оптимален для лечения каждого конкретного пациента.

Ранее нашей и другими группами были получены результаты, говорящие о том, что важную роль в формировании гетерогенности глиобластом играет то, каким именно образом осуществляется сплайсинг молекул пре-мРНК в опухолевых клетках [6]. Например, тип сплайсинга Ras и CyclinD1 определяет скорость пролиферации опухолевых клеток [7], альтернативный сплайсинг PKM изменяет тип метаболизма [8], а изоформы белков MDM4 и MDM2 регулируют чувствительность опухоли к терапии [9, 10]. Однако факторы, обусловливающие различия в сплайсинге пре-мРНК между опухолевыми клетками, роль изменений сплайсинга в прогрессии заболевания, а также механизмы влияния сплайсинга на фенотип клеток глиобластомы, до сих пор не ясны.

Для того, чтобы определить белки-регуляторы сплайсинга, наиболее сильно связанные с основ-

§ Равный вклад

[1]*Государственный Научный Центр ФГБУ ИБХ РАН им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*
**e-mail: marat.pav@mail.ru*

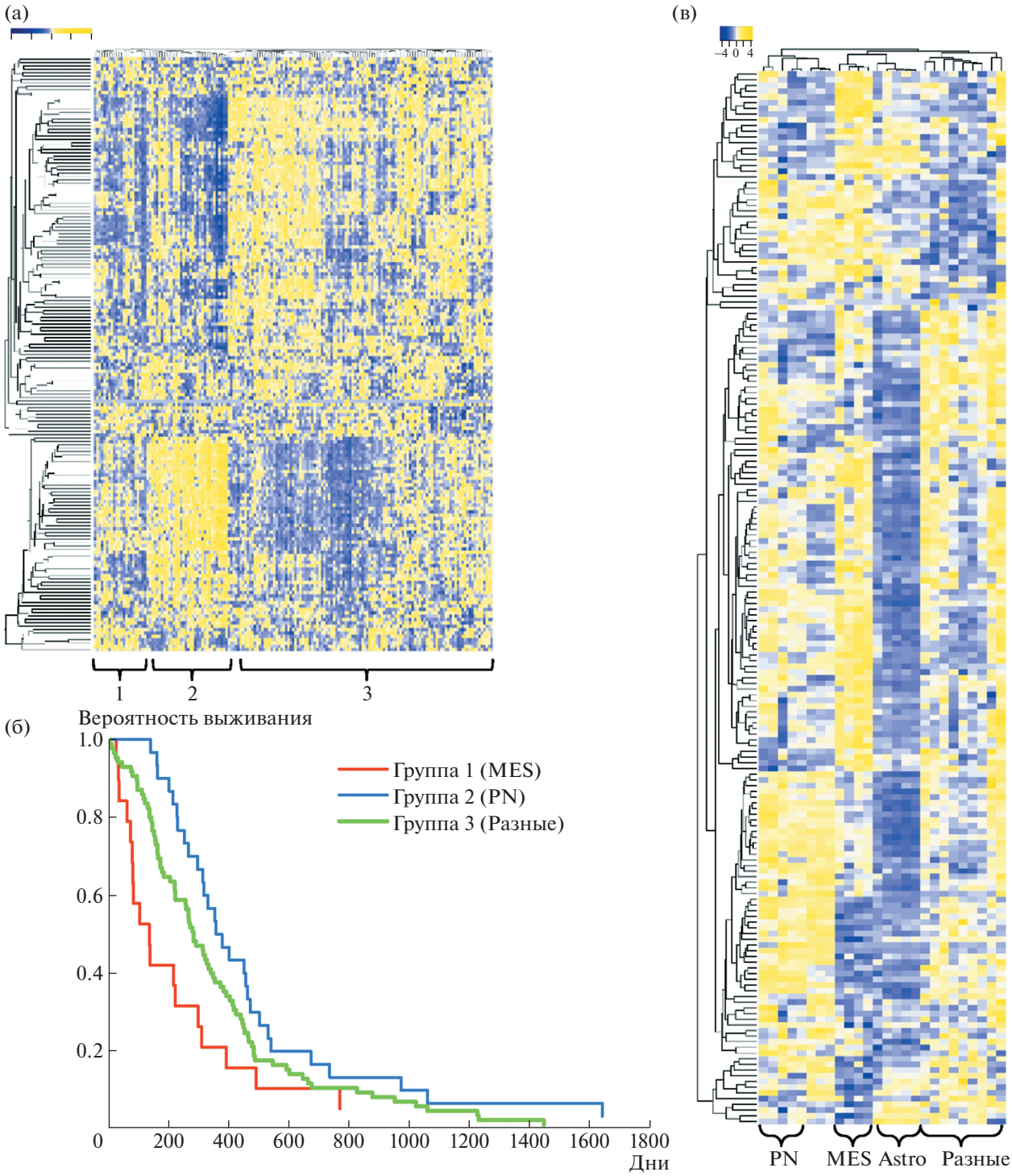
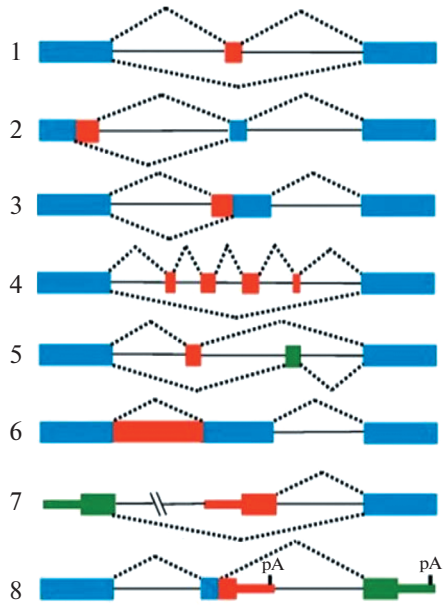


Рис. 1. Связь экспрессии сплайсосомных генов с фенотипом глиобластомы. (а) Тепловая карта, отображающая экспрессию сплайсосомных генов у пациентов с глиобластомой. (б) Кривые Каплана–Майера, показывающие выживаемость пациентов с GBM, разделенных на группы исходя из экспрессии сплайсосомных генов. (В) Тепловая карта, отображающая экспрессию сплайсосомных генов в первичных культурах нейросфер глиобластомы с различным фенотипом (PN, MES, Разные) и человеческих астроцитов (Astro).

ными свойствами глиом низкой степени злокачественности (степени II–III по классификации ВОЗ) и глиобластом (степень IV), мы решили провести биоинформатический анализ общедоступных данных секвенирования РНК из базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas), а также

(а)



(б)

Тип *сплайсинга*	Обогащение генов	FDR
Пропуск/добавление одного *экзона*	Репарация ДНК Клеточный цикл	0.003 0.008
Альтернативный 3' сайт *сплайсинга*	нет	
Альтернативный 5' сайт *сплайсинга*	нет	
Пропуск/добавление нескольких *экзонов*	Морфогенез клеток	0.03
Взаимоисключающие *экзоны*	нет	
Сохранение интрона	нет	
Альтернативное начало мРНК	Адгезия клеток Хемотаксис Дифференцировка нейронов	$4.4e^{-12}$ 0.003 0.007
Альтернативный конец мРНК	нет	

Рис. 2. Различия в сплайсинге пре-мРНК между пронейральными и мезенхимальными клетками глиобластомы. (а) Схематичное изображение различных типов событий альтернативного сплайсинга. (б) Анализ обогащения генов, мРНК которых по-разному сплайсирована в пронейральных и мезенхимальных клетках глиобластомы.

осуществить секвенирование РНК из образцов опухолевой ткани и первичных культур клеток глиобластомы, собранных нашей лабораторией за последние 5 лет.

Мы начали наш анализ с определения белков, вовлеченных в сплайсинг пре-мРНК. С помощью баз данных KEGG и NCBI мы создали список из 197 белков, предположительно способных влиять на сплайсинг. Необходимо отметить, что этот список, вероятно, является несколько избыточным, так как, исходя из анализа структуры белков и белок-белковых взаимодействий, лишь 50–150 белков в клетке могут регулировать сплайсинг напрямую [11, 12].

Проанализировав уровни экспрессии генов сплайсосомных белков у более чем 150 пациентов с глиобластомами, мы показали, что все глиобластомы можно разделить на несколько групп по экспрессии сплайсинговых факторов (рис. 1а). В первую группу, в основном, входят мезенхимальные опухоли (более 75%), и она характеризуется наихудшим прогнозом в отношении выживаемости пациентов (рис. 1б). Вторая группа состоит преимущественно из опухолей пронейронального или нейронального фенотипов (более 70%) и, наоборот, характеризуется наибольшим сроком жизни больных. Для оставшихся образцов на данном этапе работы нам не удалось выявить ярких отличительных особенностей. Далее, мы провели секвенирование транскриптома первичных культур клеток глиобластомы (18 линий), человеческих астроцитов (5 линий) и предшественников нервных клеток (3 линии). Рисунок 1в показывает, что все эти группы клеток хорошо отличимы друг от друга по уровню экспрессии генов сплайсосомных белков. В данном эксперименте легко выделялись отдельные кластеры пронейральных и мезенхимальных клеток, а также группа, содержащая плохо характеризуемые линии. Эти данные хорошо согласуются с результатами нашего анализа базы данных TCGA.

Чтобы понять, как наблюдаемые нами изменения экспрессии сплайсосомных генов влияют на процесс сплайсинга пре-мРНК, мы сравнили события альтернативного сплайсинга, обнаруженные с помощью секвенирования транскриптомов пронейральных и более агрессивных мезенхимальных первичных культур клеток глиобластомы. В общей сложности мы обнаружили 3370 событий альтернативного сплайсинга, статистически значимо отличающихся между двумя группами образцов. Эти события затрагивали такие важные опухоль-ассоциированные гены, как MDM2, MDM4, FoxM1, hRAS, Notch1, ATM, TGM2, Drosha и другие. Далее мы разделили все детектированные изменения сплайсинга на 8 типов: (1) измененный 3' сайт сплайсинга, (2) измененный 5' сайт сплайсинга, (3) альтернативный конец мРНК, (4) альтернативное начало мРНК (строго говоря, это изменение не относится к сплайсингу, а является следствием использования альтернативного промотора), (5) пропуск/добавление одного экзона,

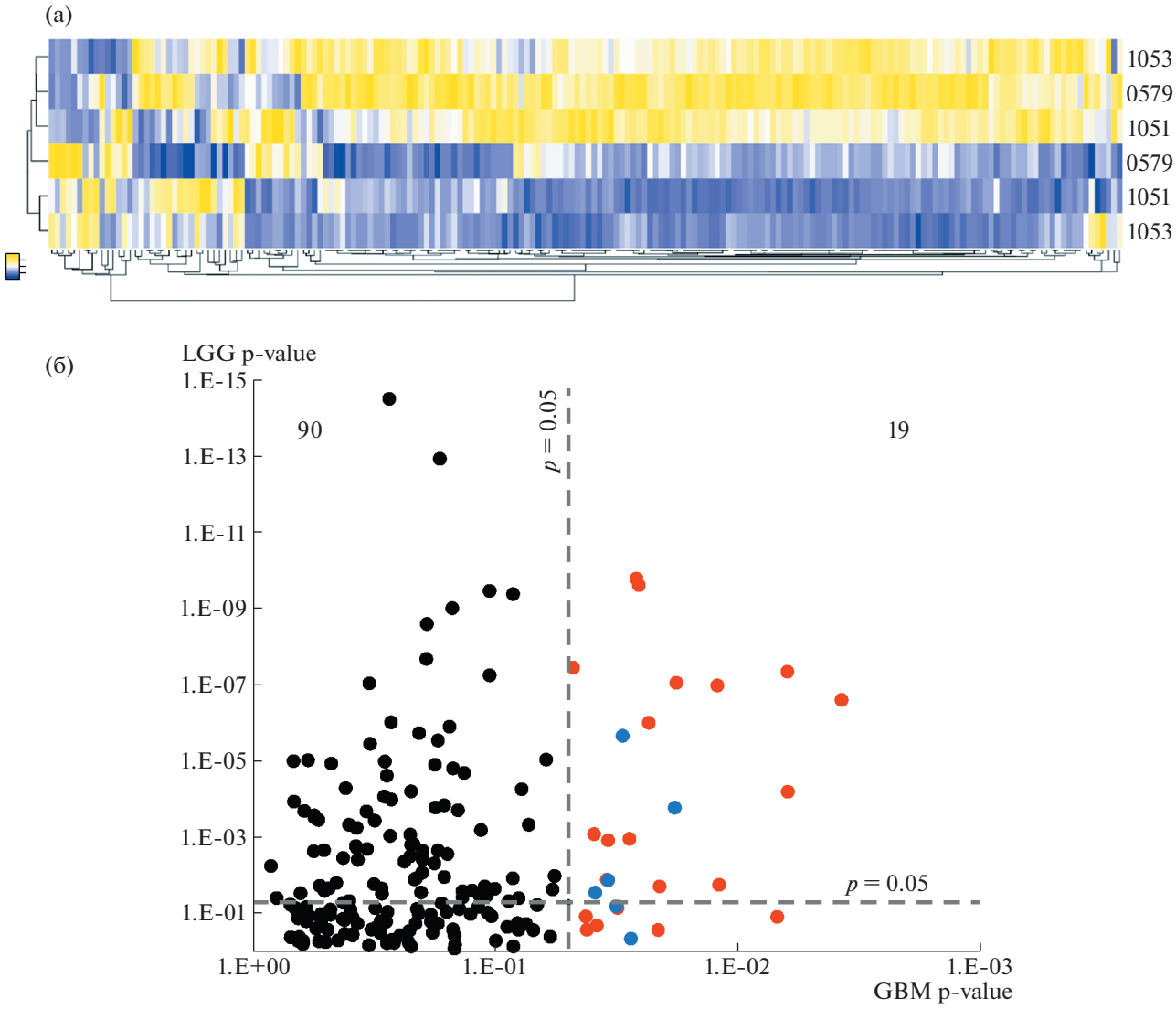


Рис. 3. Влияние белков-регуляторов сплайсинга РНК на выживаемость пациентов с глиобластомой. (а) Тепловая карта, отображающая экспрессию сплайсосомных генов в опухолевой ткани, полученной из центра (красный) или периферии (зеленый) глиобластомы от трех различных пациентов (указан номер пациента). (б) Диаграмма, иллюстрирующая факторы сплайсинга, экспрессия которых статистически значимо коррелирует с выживаемостью пациентов с глиобластомой и глиомой II–III стадии. Красными точками обозначены сплайсосомные гены, для которых низкий уровень экспрессии коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов с GBM. Синими точками обозначены сплайсосомные гены, для которых высокий уровень экспрессии коррелирует с плохим прогнозом для выживаемости пациентов.

(6) пропуск/добавление нескольких экзонов, (7) взаимоисключающие экзоны, (8) сохранение интрона (рис. 2а). Анализ обогащения генов в каждом из восьми типов событий сплайсинга показал, что для групп 1, 2, 3, 7 и 8 значимого обогащения какими-либо генами не наблюдается, однако для группы 4 мы обнаружили существенное обогащение генами, ответственными за адгезию клеток, хемотаксис и нейрональную дифференцировку. Группа 5 была обогащена транскриптами, участвующими в репарации ДНК и регуляции клеточного цикла, а группа 6 генами, кодирующими белки клеточного морфогенеза (рис. 2б).

Этот результат хорошо согласуется с фенотипическими отличиями пронейрональных и мезенхимальных клеток глиобластомы. Так, ранее нами было показано, что мезенхимальные клетки обладают повышенной скоростью миграции и инвазивностью, большей устойчивостью к повреждающим ДНК химиотерапевтическим препаратам, ускоренной пролиферацией, а также измененной клеточной морфологией [13]. Таким образом, можно утверждать, что сплайсинг пре-мРНК, действительно, определяет некоторые фенотипические особенности клеток глиобластомы.

Получив данные об экспрессии сплайсосомных генов в опухолях от разных пациентов, мы перешли к анализу уровней регуляторов сплайсинга РНК внутри одной опухоли. Ранее нами были продемонстрированы большие фенотипические различия между клетками из центра и периферии глиобластомы [14]. По этой причине мы сравнили уровни экспрессии генов-регуляторов сплайсинга в парных образцах опухолевой ткани, полученной из края и центра опухолей от 3 различных пациентов. Проанализировав данные РНК-секвенирования, мы показали, что центральная и периферическая части опухоли сильно отличаются по профилю экспрессии сплайсинговых факторов. В соответствии с этим исследованные образцы кластеризуются друг с другом не по тому, от какого пациента они были получены, а по тому, к какой зоне глиобластомы они относятся (рис. 3а). Также, интересно отметить, что, согласно нашим данным, в центральной зоне опухоли присутствует значительно большее разнообразие сплайсосомных белков, чем в клетках, инфильтрирующих нормальный мозг.

В заключение мы проанализировали базу данных TCGA с целью установить сплайсинговые факторы, экспрессия которых статистически достоверно связана с выживаемостью пациентов с глиомой II–III стадии и глиобластомой. Из рис. 3б видно, что для глиобластомы было обнаружено 27 сплайсосомных генов, экспрессия которых может служить прогностическим фактором для пациентов. Интересно, что для глиомы II–III стадии таких генов оказалось в 4 раза больше (109). Также стоит отметить, что для большинства сплайсинговых факторов (21 из 27) именно пониженная экспрессия соответствующего гена была связана с плохой выживаемостью пациентов. Этот результат хорошо согласуется с гипотезой о том, что для опухолевых и стволовых клеток характерен пониженный уровень контроля сплайсинга пре-мРНК, что позволяет увеличить разнообразие белковых изоформ в клетке, и таким образом поддерживать плюрипотентные свойства. Также эти данные являются важным подтверждением наших ранее опубликованных результатов о том, что для более эффективного противодействия терапии опухолевые клетки используют разнообразные механизмы для понижения уровня сплайсосомных белков [15].

Суммируя результаты, приведенные выше, можно утверждать, что белки-регуляторы сплайсинга играют чрезвычайно важную роль в определении фенотипа клеток глиобластомы, и, теоретически, могут быть использованы для предсказания течения заболевания пациентов с глиобластомой, однако, очевидно, необходимы дальнейшие исследования для выявления функций конкретных сплайсосомных белков.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с рукописью. Все исследования с клиническими образцами проводились в соответствии с рекомендациями, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации. У всех пациентов, включенных в исследование, было получено письменное согласие. Все клинические образцы были использованы в работе после их деидентификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., et al.* // N. Engl. J. Med. 2005. V. 352. № 10. P. 987–996.
2. *Walid M.S.* // Perm. J. 2008. V. 12. № 4. P. 45–48.
3. *Brat D.J., Verhaak R.G.W., Aldape K.D., et al.* // N. Engl. J. Med. 2015. V. 372. P. 2481–2498.
4. *Malta T.M., de Souza C.F., Sabedot T.S., et al.* // Neuro-oncol. 2018. V. 20. № 5. P. 608–620.
5. *Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R., et al.* // Cancer cell. 2006. V. 9. № 3. P. 157–173.
6. *Pavlyukov M.S., Yu H., Bastola S., et al.* // Cancer cell. 2018. V. 34. № 1. P. 119–135.e10.
7. *Li Z., Jiao X., Wang C., et al.* // Cancer res. 2010. V. 70. № 21. P. 8802–8811.
8. *David C.J., Manley J.L.* // Genes dev. 2010. V. 24. № 21. P. 2343–2364.
9. *Mancini F., Di Conza G., Moretti F.* // Curr. genomics. 2009. V. 10. № 1. P. 42–50.
10. *Cheng T.H., Cohen S.N.* // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. № 1. P. 111–119.
11. *Chen M., Manley J.L.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. № 11. P. 741–754.
12. *Schmidt C., Grønborg M., Deckert J., et al.* // RNA. 2014. V. 20. № 3. P. 406–420.
13. *Mao P., Joshi K., Li J., et al.* // Proc. № atl. Acad. Sci. U S A. 2013. V. 110. № 21. P. 8644–8649.
14. *Bastola S., Pavlyukov M.S., Yamashita D., et al.* // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 4660.
15. *Anufrieva K.S., Shender V.O., Arapidi G.P., et al.* // Genome med. 2018. V. 10. № 1. P. 49.

THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SPLICEOSOMAL PROTEINS FOR PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA

T. D. Larionova[a], T. F. Kovalenko[a], M. I. Shakhparonov[a], and M. S. Pavlyukov[a,#]

[a]*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: marat.pav@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

Glioblastoma (GBM) is considered as one of the most aggressive human cancers. Earlier our group have demonstrated that alternative RNA splicing plays an important role in the regulation of GBM phenotype. To continue this study, we analyzed the type of RNA splicing and expression levels of the spliceosomal genes in a large number of tumor tissue samples and patient-derived GBM sphere lines. We demonstrated that expression level of splicing factors allows to divide GBM patients into groups with different survival prognosis and also reflects the phenotype of the tumor. In addition, we identified the alternative splicing events that may regulate GBM phenotype. Finally, we for the first time compared the expression profiles of the spliceosomal genes in different regions of the same tumor and identified splicing factors which expression most significantly correlates with GBM patients' survival. Aforementioned data highlight the important role of pre-mRNA splicing in GBM progression.

Keywords: glioma, glioblastoma, RNA splicing, patient survival prognosis

EDN: QFOXBS
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 172–176

УДК 577.218

5-АЗАЦИТИДИН ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ OCT-1 В В-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОБЛАСТНОЙ ЛИНИИ NAMALWA

© 2022 г. А. П. Котнова[1,*], А. Г. Степченко[1], академик РАН Ю. В. Ильин[1], член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева[1], Е. В. Панкратова[1]

Поступило 30.11.2021 г.
После доработки 16.12.2021 г.
Принято к публикации 16.12.2021 г.

Сверхэкспрессия транскрипционного фактора POU2F1(Oct-1) при канцерогенезе у человека повышает злокачественный потенциал опухоли и определяет неблагоприятный прогноз как для солидных, так и для гематологических случаев заболевания. При остром миелодиспластическом лейкозе (ОМЛ) уровень Oct-1 определяет скорость развития заболевания, а понижение его экспрессии значительно задерживает развитие лейкоза у мышей, однако полный нокаут Oct-1 приводит к гибели животных. POU2F1(Oct-1) экспрессируется в клетках в виде нескольких изоформ, транскрибирующихся с альтернативных промоторов. Среди них есть как убиквитарная, так и тканеспецифические изоформы. Мы показали, что в клетках лимфомы Беркитта Namalwa 5-азацитидин специфически подавляет экспрессию мРНК тканеспецифической изоформы Oct-1L, уровень которой аномально повышен в этих клетках, при этом не вызывая изменений количества мРНК убиквитарной изоформы Oct-1A. Полученные результаты показывают, что можно избирательно понижать уровень транскрипции изоформы Oct-1L, аберрантно экспрессирующейся в опухолевых клетках человека.

Ключевые слова: фактор транскрипции POU2F1(Oct-1), альтернативные промоторы, 5-азацитидин, лимфома Беркитта

DOI: 10.31857/S2686738922020123

Злокачественные опухоли кроветворной и лимфоидной ткани составляют примерно 8% всех злокачественных заболеваний. Они делятся на две большие группы – лимфомы и лейкозы; многие из них характеризуются неблагоприятным прогнозом и низким уровнем выживаемости. Поиск маркеров и терапевтических мишеней для персонифицированного лечения онкологических заболеваний показал, что продукт гена POU2F1(Oct-1) является чрезвычайно значимым фактором развития и прогрессирования многих злокачественных опухолей как эпителиального происхождения, так и опухолей кроветворной и лимфоидной ткани [1].

Фактор транскрипции Oct-1 принадлежит к семейству POU-факторов транскрипции с высококонсервативным ДНК-связывающим доменом и контролирует дифференцировку, выживаемость и пролиферацию клеток иммунной системы и гемопоэтических клеток [2, 3]. Oct-1 экспрессируется во всех клетках организма, регулирует дифференцировку В- , Т-клеток и стволовых гемопоэтических клеток [2, 3] и является фактором защиты клетки от разных видов стресса: генотоксического, окислительного, гипоксического, стресса эндоплазматического ретикулума, а также модулирует ответ клетки на химиотерапевтические препараты [4, 5].

Повышение уровня экспрессии Oct-1 в опухолевых клетках вносит существенный вклад в неблагоприятный прогноз развития онкологических заболеваний. Так, например, определение уровня экспрессии POU2F1(Oct-1) при раке желудка имеет даже более высокое прогностическое значение, чем определение стадии (I-IV) заболевания по AJCC [6]. Для опухолей кроветворной системы проонкогенные функции Oct-1 были описаны для лимфомы Ходжкина, лимфомы тимуса, диффузной крупноклеточной В-лимфомы, острого миелоидного лейкоза [7–9]. Сверхэкспрессия Oct-1 часто наблюдается при диффузной В-крупноклеточной лимфоме и является независимым прогностическим фактором неблагопри-

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия*
**e-mail: alina_kotnova@mail.ru*

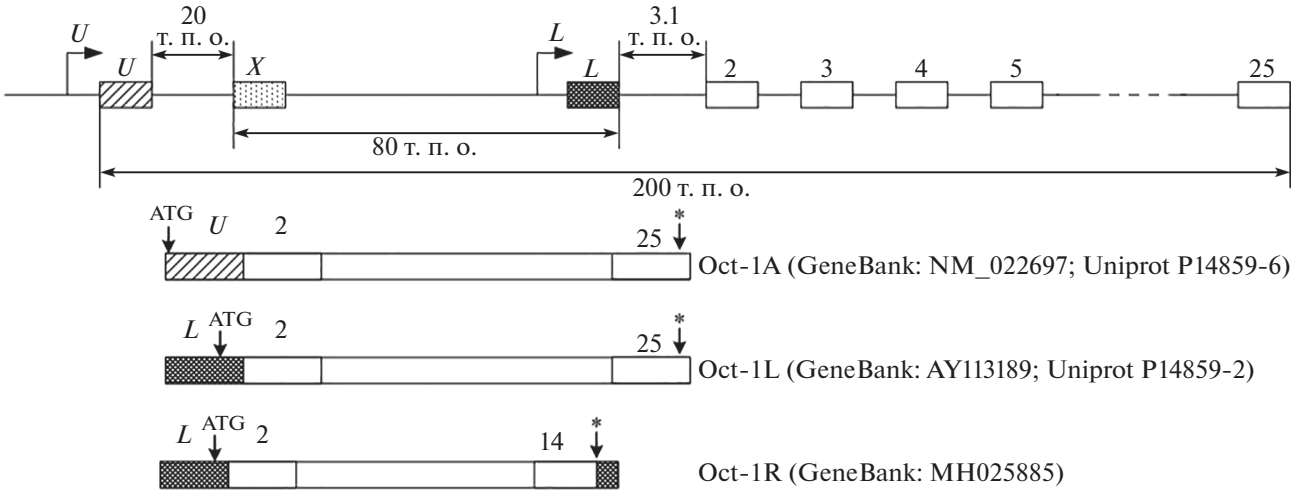


Рис. 1. Экзон-интронная организация гена POU2F1(Oct-1). Схема строения изоформ, транскрибирующихся с убиквитарного промотора U и тканеспецифического промотора L. Экзоны обозначены прямоугольниками. Альтернативные 5'-концевые экзоны обозначены штриховкой. Начало транскрипции показано на схеме гена поворотными стрелками. Начало трансляции и стоп-кодоны обозначены стрелками и звездочками соответственно.

ятного исхода [8]. Oct-1 является важным регулятором лейкемогенности и гемопоэтического стресса. Высокий уровень экспрессии фактора транскрипции Oct-1 защищает гемопоэтические клетки от стресса, но способствует развитию лимфомы тимуса [1] и острого миелоидного лейкоза [9] у мышей. Напротив, подавление Oct-1 защищает мышей от лейкемии, вызванной гибридным онкопротеином MLL-AF9. Комбинация этой модельной системы ОМЛ с нокаутом Oct-1 показала, что потеря одного аллеля Oct-1 значительно задерживает развитие лейкоза. Делеция обоих аллелей Oct-1 полностью защищает мышей от лейкоза, но приводит к недостаточности костного мозга и гибели животных. [9]. Анализ этих данных указывает на то, что Oct-1 – мощный фактор, определяющий злокачественный потенциал опухоли и ее ответ на действие химиотерапевтических препаратов.

Полифункциональность Oct-1 в значительной степени определяется тем, что он существует в клетке в виде ряда различных изоформ, которые образуются за счет альтернативного сплайсинга и/или альтернативной инициации транскрипции [10]. В гене POU2F1 существуют альтернативные промоторы [10–12]. Как видно из рис. 1, считываемые с них транскрипты имеют разные первые экзоны и кодируют изоформы, различающиеся своими N-концевыми последовательностями [11]: убиквитарная изоформа Oct-1A считывается с промотора U, а тканеспецифические изоформы Oct-1L и Oct-1R – с промотора L.

Экспрессия изоформ Oct-1 изменяется во время дифференцировки гематопоэтических клеток: в плюрипотентных гематопоэтических клетках CD34+ (ПГК) Oct-1L экспрессируется на высоком уровне; во время дифференцировки Т-клеток (CD3+) и клеток моноцитарного ряда (CD14+) его уровень экспрессии резко падает, но при этом почти не изменяется при дифференцировке В-клеток (CD19 +) [13, 14]. Изоформа Oct-1R у человека экспрессируется только в В-клетках, в ПГК она не обнаружена [13]. Характерно, что уровень убиквитарной изоформы Oct-1A не претерпевает значительных изменений при дифференцировке гематопоэтических клеток.

Во всех нормальных кроветворных клетках активность тканеспецифического промотора L, а следовательно, и концентрация тканеспецифических изоформ, ниже, чем активность убиквитарного промотора U и концентрация убиквитарной изоформы Oct-1A. При этом в В-клеточных лимфомах Беркитта Namalwa и Raji данное соотношение нарушено, и концентрация изоформы L значительно превосходит содержание в клетках изоформы A. Концентрация тканеспецифичной изоформы Oct-1L в В-клетках Namalwa в несколько раз выше, чем в нормальных В-клетках (CD19+) [13]; уровень ее экспрессии также повышен в Т-клеточной линии Jurkat по сравнению с нормальными Т-клетками (CD3 +) [13]. Примечательно, что все эти клеточные линии изначально были получены из низкодифференцированных лимфобластов.

Ранее было показано, что сверхэкспрессия Oct-1R и Oct-1L в клетках Namalwa приводит к репрессии многих генов, участвующих в дифференцировке В- и Т-лимфоцитов, а также клеток моноцитарного ряда (CD14+) [13, 14]. Высокий уровень изоформы Oct-1L, наблюдаемый в лимфобластных линиях опухолевых клеток, показывает, что избыток Oct-1L, по всей видимости,

значительно уменьшает их способность к дифференцировке. Существование альтернативных промоторов в гене POU2F1(Oct-1) позволяет влиять не только на экспрессию тотального Oct-1, что губительно сказывается на организме, но также на экспрессию отдельных его изоформ, уровень которых повышен в опухолевых клетках.

В данной работе мы исследовали влияние 5-азацитидина на транскрипцию гена POU2F1 и показали, что он избирательно подавляет транскрипцию с тканеспецифического L-промотора гена POU2F1 и уменьшает концентрацию изоформы Oct-L в опухолевых клетках лимфомы Беркитта Namalwa.

Ингибитор метилирования ДНК 5-азацитидин применяется в клинической практике для лечения миелодиспластического синдрома (МДС) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Для изучения его влияния на уровень транскрипции альтернативных изоформ белка Oct-1 клетки Namalwa рассевали в 6-луночные планшеты по 2×10^6 на лунку в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки. К клеткам добавляли 5-азацитидин (5-Azacytidine, Sigma-Aldrich), растворенный в 8 мкл ДМСО, в следующих концентрациях: 10, 5, 2.5, 1.25 μM. В контрольные лунки добавляли по 8 мкл ДМСО. Для оценки воздействия 5-азацитидина на уровень транскрипции разных изоформ Oct-1 из клеточной культуры выделяли РНК тризольным методом, после чего проводили обратную транскрипцию с использованием набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) и ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных к изоформам A и L (Oct-1A-sense: 5'-tattcaaaatggcggacgga-3'; Oct-1L-sense: 5'-ccaccccaaactgctacctgt-3'; Oct-1-antisense, общий для обеих изоформ: 5'-ctgacggattgttcattcttgagt-3'). Нормировку проводили по гену GUS: GUS sense: 5'-cgtggttggagagctcatttgga-3' и GUS antisense 5'-attccccagcactctcgtcggt-3'.

Как видно из рис. 2, при культивировании клеток Namalwa в течение 24 ч в среде, содержащей 5-азацитидин, значительно снижается количество изоформы Oct-1L, транскрибирующейся с альтернативного тканеспецифического промотора L, тогда как количество мРНК убиквитарной изоформы Oct-1A практически не изменяется. Этот эффект дозозависимый и проявляется на уровне концентраций, применяемых в клинической практике. При концентрации 5-азацитидина 10 μM в культуральной среде количество мРНК Oct-1L в клетках Namalwa снижалось в три раза по сравнению с контролем, а при концентрации 5 μM – в два раза. Дальнейшее понижение концентрации 5-азацитидина не вызывало достоверных изменений в экспрессии Oct-1L.

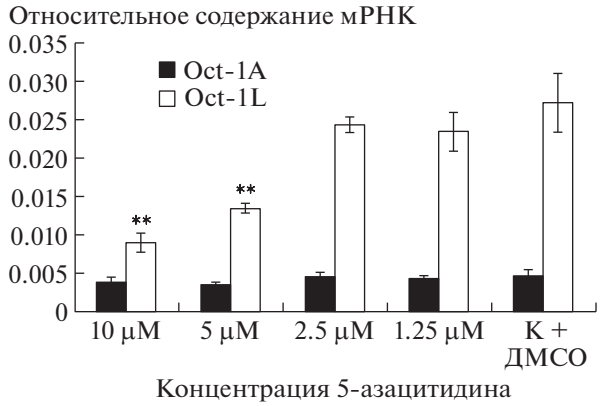


Рис. 2. Влияние 5-азацитидина на транскрипцию с альтернативных промоторов U и L гена POU2F1(Oct-1). Результаты количественной ПЦР. На диаграмме представлено среднее значение ±S.E.M. для трех независимых экспериментов; t-тесты были выполнены, чтобы определить, существует ли значимая разница между средними значениями для контрольных и обработанных клеток ($^{**}p < 0.01$).

Из представленных результатов видно, что 5-азацитидин подавляет транскрипцию с тканеспецифического промотора L, снижая концентрацию тканеспецифических изоформ в опухолевых клетках, но практически не влияет на транскрипцию с убиквитарного промотора U и концентрацию мРНК убиквитарной изоформы A.

В низких концентрациях, которые применяются в настоящее время в онкогематологической практике, 5-азацитидин является гипометилирующим агентом, который ингибирует ДНК-метилтрансферазу путем включения в ДНК азацитидинтрифосфата. Это приводит к потере метилирования ДНК и реактивации репрессированных генов. Считается, что патологические паттерны метилирования ДНК определяют развитие миелодиспластических синдромов высокого риска и острого миелоцитарного лейкоза, а гипометилирование может восстанавливать нормальную функцию генов, контролирующих дифференцировку и пролиферацию [15–17]. После 16 лет клинического применения 5-азацитидина он остается основным препаратом для лечения МДС и ОМЛ. Однако точный механизм его действия все еще до конца не изучен [17]. В нашей работе было показано, что 5-азацитидин подавляет транскрипцию с тканеспецифического L-промотора гена POU2F1 и избирательно снижает экспрессию изоформы Oct-1L в два-три раза при концентрациях, используемых в клинической практике.

Мы провели анализ области альтернативного промотора L гена POU2F1 и не обнаружили там CpG-островков, которые могли бы подвергаться метилированию, поэтому мы полагаем, что обнаруженный нами эффект 5-азацитидина не связан

с деметилированием промотора L. Возможно, деметилированию подвергаются более отдаленные участки гена POU2F1, регулирующие транскрипцию тканеспецифического промотора, или проявляются другие свойства 5-азацитидина, не связанные с деметилированием.

При лечении онкологических заболеваний следует обратить внимание на следующие факты: 1) высокий уровень экспрессии Oct-1 осложняет течение заболевания при таких гематологических опухолях, как ОМЛ, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Ходжкина, лимфома тимуса; 2) искусственно вызванная гипоэкспрессия Oct-1 при ОМЛ задерживает развитие лейкоза; 3) в В- и Т-клеточных лимфомах (линии клеток Namalwa, Raji, Jurkat) наблюдается аномально высокая экспрессия изоформы Oct-1L, нехарактерная для нормальных лимфоидных клеток; 4) в некоторых опухолевых линиях клеток уровень экспрессии изоформы Oct-1L значительно превышает таковой у нормальных клеток того же происхождения [18]. Из совокупности этих данных можно сделать вывод, что аберрантная экспрессия тканеспецифической изоформы Oct-1L является фактором неблагоприятного прогноза и может стать терапевтической мишенью для опухолей, в которых наблюдается высокий уровень Oct-1. В этих случаях возможно применение в комбинированной терапии 5-азацитидина, избирательно подавляющего экспрессию изоформы Oct-1L. Это предположение требует дальнейшего анализа экспрессии изоформ Oct-1 в первичных опухолях.

Из клинической практики известно, что монотерапия 5-азацитидином эффективна при лечении МДС и ОМЛ. Однако в настоящее время нет достаточных доказательств в поддержку применения 5-азацитидина при лечении солидных опухолей или других гематологических злокачественных новообразований. Единственная попытка применения 5-азацитидина для лечения солидных опухолей была предпринята в 1977 г. Противоопухолевый эффект наблюдался только у 17% обследованных пациентов с карциномой груди и у 21% пациентов со злокачественными лимфомами. В результате был сделан вывод, что препарат неэффективен при солидных опухолях [15]. Однако исследования последних лет показали, что опухоли следует разделять по уровню экспрессии Oct-1. Сверхэкспрессия Oct-1 коррелирует с агрессивностью опухоли при раке груди, пищевода, желудка, простаты, легких, головы и шеи, шейки матки, колоректального рака, диффузной В-крупноклеточной лимфомы и других злокачественных опухолей [1, 8]. Возможно, положительный противоопухолевый эффект 5-азацитидина в исследовании 1977 г. наблюдался именно у пациентов со сверхэкспрессией Oct-1L в опухоли.

Наши результаты подтверждают важность детального анализа экспрессии генов как стратегии выявления новых биомаркеров и терапевтических мишеней при лимфомах и лейкозах. Способность 5-азацитидина подавлять экспрессию Oct-1L в опухолевых клетках может стать важным шагом для его применения при лечении опухолей с повышенным уровнем экспрессии Oct-1L.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта российского научного фонда (грант № 19-14-00365).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vázquez-Arreguín K., Tantin D.* The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks // Biochim Biophys Acta. 2016. V. 1859. № 6. P. 792–804.
2. *Maddox J., Shakya A., South S., et al.* Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant // PLoS Genet. 2012. V. 8. P. e1003048.
3. *Shakya A., Goren A., Shalek A., et al.* Oct1 and OCA-B are selectively required for CD4 memory T cell function // J. Exp. Med. 2015. V. 212. P. 2115–2131.
4. *Shakya A., Cooksey R., Cox J.E., Wang V., McClain D.A., Tantin D.* Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity // Nat Cell Biol. 2009. V. 11. № 3. P. 320–327.
5. *Порцева Т.Н., Панкратова Е.В., Степченко А.Г., Георгиева С.Г.* Повышение уровня белка OCT-1 в опухолевых клетках модулирует клеточный ответ на противоопухолевые препараты // ДАН. 2016. Т. 469. С. 366–370.
6. *Qian J., Kong X., Deng N., et al.* OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer // Gut. 2015. V. 64. № 1. P. 37–48.
7. *García-Cosío M., Santón A., Martín P., et al.* Analysis of transcription factor OCT.1, OCT.2 and BOB.1 expression using tissue arrays in classical Hodgkin's lymphoma // Mod Pathol. 2004. V. 17. № 12. P. 1531–1538.
8. *Gouveia G.R., Ferreira S.C., Siqueira S.A.C., et al.* Overexpression of OCT-1 gene is a biomarker of adverse prognosis for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): data from a retrospective cohort of 77 Brazilian patients. // BMC Cancer. 2020. V. 20. № 1. P. 1041.
9. *Jafek J.L., Shakya A., Tai P.Y., et al.* Transcription factor Oct1 protects against hematopoietic stress and promotes acute myeloid leukemia. // Exp Hematol. 2019. V. 76. P. 38–48.e2.
10. *Сытина Е.В., Панкратова Е.В.* Фактор транскрипции Oct-1 – пластичность и полифункциональность. // Молекулярная биология. 2003. Т. 37 № 5. С. 755–767.
11. *Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Portseva T., Mogila V.A., Georgieva S.G.* Different N-terminal isoforms of Oct-1 control expression of distinct sets of genes and their high levels in Namalwa Burkitt's lymphoma cells affect

a wide range of cellular processes // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 19. P. 9218–9230.

12. *Pankratova E.V., Deyev I.E., Zhenilo S.V., Polanovsky O.L.* Tissue-specific isoforms of the ubiquitous transcription factor Oct-1 // Mol Genet Genomics. 2001. V. 266. № 2. P. 239–245.
13. *Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Krylova I.D., Portseva T.N., Georgieva S.G.* The regulatory interplay between Oct-1 isoforms contributes to hematopoiesis and the isoforms imbalance correlates with a malignant transformation of B cells // Oncotarget. 2018. V. 9. № 52. P. 29892–29905.
14. *Stepchenko A.G., Lyanova B.M., Krylova I.D., Ilyin Y.V., Georgieva S.G., Pankratova E.V.* Differentiation of Monocytic Cells Is Accompanied by a Change in the Expression of the Set of Oct-1 Isoforms // Dokl Biochem Biophys. 2018. V. 483. P. 306–308.
15. *Семочкин С.В., Толстых Т.Н., Румянцев А.Г.* Миелодиспластические синдромы: терапевтические проблемы и решения // Онкогематология. 2012. Т. 2. С. 57–66.
16. *Овечкина В.Н., Бондаренко СН., Морозова Е.В., Слесарчук О.А., Смирнова А.Г., Екушев К.А., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В.* Эффективность и безопасность применения 5-азацитидина после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при остром миелобластном лейкозе и миелодиспластическом синдроме. // Клеточная терапия и трансплантация 2015. Т. 5. С. 71.
17. *Kordella C., Lamprianidou E., Kotsianidis I.* Mechanisms of Action of Hypomethylating Agents: Endogenous Retroelements at the Epicenter. // Front Oncol. 2021. V. 11. P. 650473.
18. *Luchina N.N., Krivega I.V., Pankratova E.V.* Human Oct-1L isoform has tissue-specific expression pattern similar to Oct-2. // Immunol Lett. 2003. V. 85. № 3. P. 237–241.

5-AZACYTIDINE SUPPRESSES THE EXPRESSION OF TISSUE-SPECIFIC OCT-1 ISOFORM IN NAMALWA BURKITT'S LYMPHOMA CELL CULTURE

A. P. Kotnova[a,#], A. G. Stepchenko[a], Academician of the RAS Yu. V. Ilyin[a], Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva[a], and E. V. Pankratova[a]

[a] *Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: alina_kotnova@mail.ru*

Overexpression of the transcription factor POU2F1 (Oct-1) increases the malignant potential of the tumor and determines the unfavorable prognosis for both solid and hematological cases of the disease in human carcinogenesis. The Oct-1 level determines the rate of development of the disease in acute myelodysplastic leukemia (AML), and a decrease in its expression significantly delays the development of leukemia in mice; however, a complete knockout of Oct-1 leads to the death of the animals. POU2F1 (Oct-1) is expressed as several isoforms transcribed from alternative promoters. They include both ubiquitous and tissue-specific isoforms. It was shown that in Burkitt's lymphoma Namalwa cells 5-azacytidine specifically suppresses the expression of the tissue-specific isoform Oct-1L mRNA (level of Oct-1L is abnormally increased in these cells), while not causing changes in the amount of the ubiquitous isoform Oct-1A mRNA. These results show that it is possible to selectively reduce the transcription level of the Oct-1L isoform aberrantly expressed in human tumor cells.

Keywords: transcription factor POU2F1 (Oct-1), alternative promoters, 5-azacytidine, Burkitt's lymphoma

EDN: THDUVL
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 177–182

УДК 577.332.23:539.199

ОБНАРУЖЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА СТИМУЛЯТОРА СВЕТОИЗЛУЧЕНИЯ БАЗИДИОМИЦЕТА *Neonothopanus nambi*

© 2022 г. Н. О. Ронжин[1,*], Е. Д. Посохина[1], О. А. Могильная[1], В. С. Бондарь[1]

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи
Поступило 09.12.2021 г.
После доработки 23.12.2021 г.
Принято к публикации 23.12.2021 г.

В водном экстракте из мицелия светящегося базидиомицета *Neonothopanus nambi* после его обработки β-глюкозидазой обнаружен стимулятор светоизлучения гриба. Добавки экстракта к светящемуся мицелию увеличивают уровень световой эмиссии от нескольких раз до 1.5 порядков и более. Стимулятор свечения является низкомолекулярным, термостабильным соединением – выявляется в подмембранной фракции при фильтрации экстракта через мембрану с пределом исключения 10 кДа, сохраняет стимулирующий эффект после термообработки при 100°С в течение 5 мин. В спектре поглощения водного образца стимулятора наблюдаются два основных пика в коротковолновой области (205 и 260 нм) и плечо в диапазоне 350–370 нм. Стимулятор свечения обладает синей флуоресценцией с максимумом эмиссии 440 нм при возбуждении длиной волны 360 нм. Установлено, что стимулирующий свечение компонент не является субстратом (или его предшественником) люминесцентной системы гриба *N. nambi*.

Ключевые слова: биолюминесценция, *Neonothopanus nambi*, светящийся мицелий, стимулятор свечения, флуоресценция

DOI: 10.31857/S2686738922020172

В недавних исследованиях мы использовали оригинальный способ обработки мицелия светящегося базидиомицета *Neonothopanus nambi* β-глюкозидазой для выделения его экстраклеточных ферментов с оксидазной функцией [1]. В дополнительных экспериментах с полученными водными экстрактами мы обнаружили интересный эффект. Добавки аликвот экстракта к образцам светящегося мицелия *N. nambi* значительно увеличивали интенсивность их световой эмиссии. При этом сами экстракты не обладали регистрируемым свечением. Это позволило высказать предположение, что в экстрактах присутствует компонент, который стимулирует свечение гриба.

Настоящая работа посвящена изучению некоторых свойств обнаруженного стимулятора свечения базидиомицета *N. nambi*.

В работе использовали мицелий высшего гриба *N. nambi* IBSO 2391 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) Института биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск), который был ранее предоставлен Н.В. Псурцевой из Коллекции культур базидиомицетов LE-BIN Ботанического института РАН (Санкт-Петербург). Эксперименты проводили с шарообразными пеллетами мицелия диаметром 2–7 мм, полученными при глубинном культивировании гриба в жидкой картофельно-сахарозной среде (“HiMedia Laboratory”, Индия) [1]. Выращивание биомассы проводили в течение 8 сут. После культивирования пеллеты извлекали из питательной среды и многократно промывали деионизированной (ДИ) водой (Milli-Q system, “Millipore”, США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Водный экстракт, содержащий стимулятор свечения базидиомицета *N. nambi*, получали следующим образом. Отмытые пеллеты мицелия помещали в свежий объем ДИ воды, содержащей β-глюкозидазу из сладкого миндаля (“Serva”, Германия) в концентрации 0.5 МЕ/мл, и инкубировали при 25°С в течение 24 ч при медленном перемешивании со скоростью 80 об/мин (шейкер OS-10, “BIOSAN”, Латвия). Исходный раствор β-глюкозидазы готовили в 10 мМ фосфатном буфере (pH 6.0). После инкубации жидкую часть (водный экстракт) отделяли от биомассы фильтрацией через бумажный фильтр. Разделение высоко- и низкомолекулярных компонентов полученного экстракта проводили с помощью его ультрафильтрации через мембрану с пределом

[1]*Институт биофизики Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия*
**e-mail: roniol@mail.ru*

исключения 10 кДа (“EMD Millipore Amicon, Darmstadt”, Германия). Для более полного отделения низкомолекулярных соединений от высокомолекулярных компонентов при ультрафильтрации экстракта в нем трижды заменяли ДИ воду, каждый раз собирая подмембранные фильтраты. После завершения диализа надмембранную фракцию, содержащую высокомолекулярные компоненты экстракта (экстраклеточные белки и ферменты гриба), отбирали и использовали в исследованиях. Содержащие низкомолекулярные компоненты подмембранные фильтраты объединяли и концентрировали на роторном испарителе Rotavapor R-215 (“Buchi”, Швейцария). Полученный концентрат использовали в экспериментах.

Спектральные исследования водных образцов, содержащих низкомолекулярные компоненты (экстракт, концентрат и пробы после его хроматографии), проводили на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония) и спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (“Agilent Technologies”, США).

Фракционирование низкомолекулярных компонентов и предварительную оценку молекулярной массы изучаемого стимулятора свечения проводили с помощью гель-фильтрационной хроматографии концентрата на колонке (0.8 × 20 см) с Bio-Gel P2 (“Bio-Rad”, США), уравновешенной ДИ водой. На колонку наносили 0.5 мл концентрата. Хроматографию проводили при скорости протока 0.2 мл/мин, используя в качестве элюента ДИ воду и собирая пробы объемом 1 мл. Наличие и распределение стимулятора в хроматографических пробах определяли по интенсивности их флуоресценции, регистрируемой при длине волны 440 нм (Varian Cary Eclipse) после возбуждения длиной волны 360 нм. Для оценки молекулярной массы стимулирующего компонента, при указанных выше условиях (размер колонки, объем наносимого образца, элюент и скорость протока) проводили хроматографию маркерных соединений, растворы которых готовили в ДИ воде. В качестве маркеров использовали рибофлавин и ФМН (“Sigma”, США), и НАД (“Serva”, Германия) с молекулярными массами 0.38, 0.46 и 0.66 кДа соответственно.

Эффект стимулятора на свечение гриба *N. nambi* оценивали с использованием пеллет мицелия, выращенных, как изложено выше, и проинкубированных в ДИ воде в течение 12 ч для более полного удаления остатков питательной среды и метаболитов. Интенсивность и динамику люминесценции регистрировали с помощью люминометра Glomax® 20/20 (“Promega BioSystems Sunnyvale, Inc.”, США) в режиме одно измерение в секунду. Индивидуальные пеллеты мицелия помещали в прозрачные пластиковые пробирки объемом 1.5 мл (“Eppendorf”, Германия), содержащие 500 мкл ДИ воды. Пробирки устанавливали в измерительную камеру люминометра и регистрировали начальный уровень свечения пеллет. После этого в пробы аккуратно (без перемешивания) вносили 5 мкл тестируемого образца стимулятора и вновь регистрировали интенсивность и динамику светового сигнала пеллет. Уровень люминесценции выражали в относительных единицах.

При исследовании термостабильности изучаемого стимулятора образцы концентрата низкомолекулярных соединений (объем 200 мкл) помещали в пластиковые пробирки и инкубировали при 100°C (термостат TB-85 Thermo Batch, “Shimadzu”, Япония) в течение 1–5 мин. После этого пробы охлаждали в ледяной бане и затем оценивали эффект термообработанного стимулятора на свечение мицелия *N. nambi*, как изложено выше.

Для проверки применимости обнаруженного стимулятора в качестве субстрата светоизлучающей системы базидиомицета *N. nambi* использовали люминесцентную систему, выделенную из мицелия гриба изложенным нами ранее методом [2]. Проверку функциональной активности полученной системы проводили следующим образом. Аликвоты препарата выделенной системы объемом 200 мкл вносили в пластиковые пробирки, которые помещали в люминометр (Glomax® 20/20) и добавкой 5 мкл раствора 10 мМ НАДФН и 5 мкл раствора 33 мкМ гиспидина инициировали люминесцентную реакцию, регистрируя интенсивность и динамику световой эмиссии. Доказано, что гиспидин является предшественником субстрата реакции светоизлучения высших грибов, который преобразуется НАД(Ф)Н-зависимой гидроксилазой в 3-гидроксигиспидин (люциферин) и затем окисляется люциферазой с излучением квантов видимого света [3–8], что согласуется с высказанной ранее гипотезой о двухстадийном процессе свечения базидиомицетов [9, 10]. В работе использовали НАДФН (“Serva”, Германия) и гиспидин (“Sigma-Aldrich”, США). Исходный раствор гиспидина с концентрацией 20 мМ готовили в метаноле (“Sigma-Aldrich”) и хранили при температуре –20°C. Для экспериментов водный раствор гиспидина с концентрацией 33 мкМ готовили *in situ* последовательными разведениями исходного раствора ДИ водой. Оценку применимости стимулятора в качестве субстрата (или его предшественника) светоизлучающей реакции проводили с помощью выделенной люминесцентной системы при указанных выше экспериментальных условиях. В этом случае вместо раствора гиспидина в реакционную смесь добавляли 5 мкл водного образца стимулятора.

В исследованиях мы установили, что обнаруженный нами стимулятор свечения базидиомицета *N. nambi* является низкомолекулярным со-

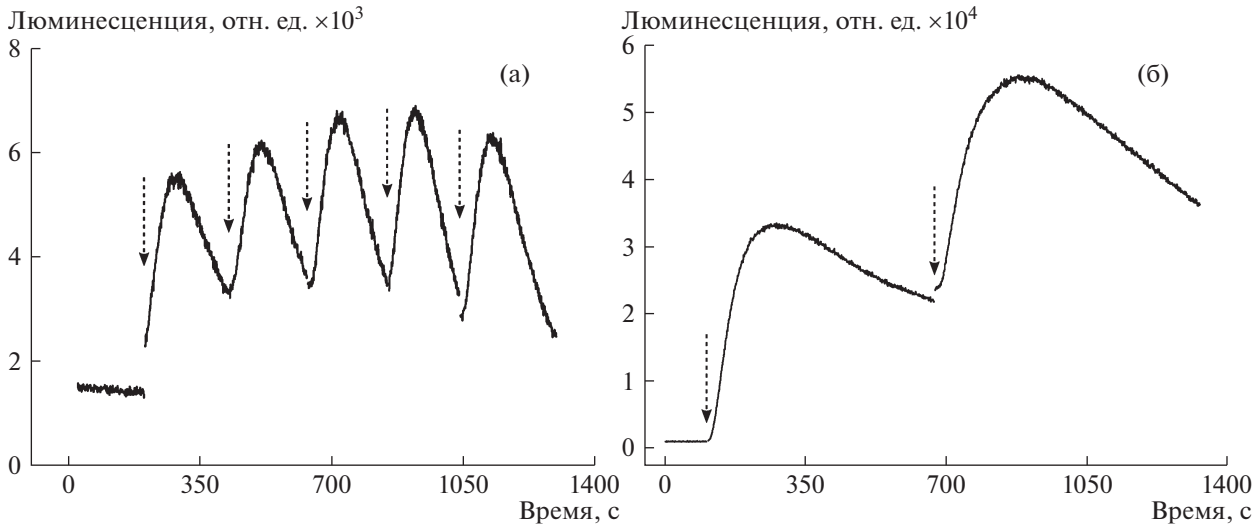


Рис. 1. Эффект возрастания интенсивности свечения пеллет мицелия *N. nambi* от нескольких раз (а) до 1.5 порядков (б) при последовательных добавках концентрата низкомолекулярных компонентов. Стрелками показаны моменты добавления концентрата (по 5 мкл) в пробу.

единением. При добавлении аликвот концентрата низкомолекулярных компонентов к пеллетам светящегося мицелия мы наблюдали быстрый (несколько секунд) подъем уровня их световой эмиссии, который мог превышать начальный уровень от нескольких раз до 1.5 порядков и более (рис. 1). Из представленных данных видно, что после выхода светового сигнала на максимум наблюдается его снижение в течение нескольких минут. Повторные добавки концентрата вновь стимулировали подъем свечения с амплитудой светового сигнала, соизмеримого или превышающего первый сигнал (рис. 1). Стимуляцию свечения мицелия *N. nambi* мы наблюдали при последовательных многократных (4–6 раз) добавках концентрата низкомолекулярных компонентов к одним и тем же образцам пеллет. В то же время добавки к светящимся пеллетам 5 мкл концентрата высокомолекулярных соединений (надмембранная фракция после ультрафильтрации экстракта) не вызывали сколько-нибудь заметных изменений в уровнях их световой эмиссии. Важно отметить, что использованные нами концентраты высоко- и низкомолекулярных компонентов экстракта из пеллет мицелия *N. nambi* не обладали регистрируемым свечением. При тестировании обоих препаратов уровни их люминесценции не отличались от фонового сигнала измерительного прибора (люминометр Glomax® 20/20).

В работе мы установили, что обнаруженный нами стимулятор свечения гриба *N. nambi* является термостабильным соединением и сохраняет стимулирующий эффект после термообработки концентрата низкомолекулярных компонентов при 100°C в течение 5 мин.

В спектре поглощения концентрата, содержащего стимулятор свечения, мы выявили наличие двух основных пиков в коротковолновой области при 205 и 260 нм и плеча в районе 350–370 нм (рис. 2). В экспериментах было установлено, что возбуждение водных образцов концентрата длинами волн 350–370 нм сопровождается их флуоресценцией с максимумом световой эмиссии при 440 нм (рис. 2). При этом важно отметить, что мы не выявили изменений в спектре флуоресценции и величине максимума световой эмиссии после термообработки содержащего стимулятор свечения концентра в течение 5 мин при 100°C. Это позволило высказать версию, что обнаруженный нами термоустойчивый стимулятор свечения гриба *N. nambi* является флуоресцентным соединением.

Экспериментальную проверку высказанного выше предположения осуществляли следующим образом. Вначале мы провели разделение низкомолекулярных компонентов концентрата с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке с Bio-Gel P2 с последующей оценкой уровня флуоресценции в полученных хроматографических пробах. При скрининге хроматографических фракций мы выявили наличие только одного пика флуоресценции (рис. 3). Исходя из этого, на следующей стадии мы объединили фракции, находящиеся на подъеме, в максимуме и на спаде флуоресцентного пика в три отдельных образца – 1, 2 и 3 соответственно, которые были затем сконцентрированы на роторном концентраторе (Concentrator 5301, “Eppendorf”, Германия) до одинаковых объемов. Сравнительную оценку эффекта полученных концентратов на

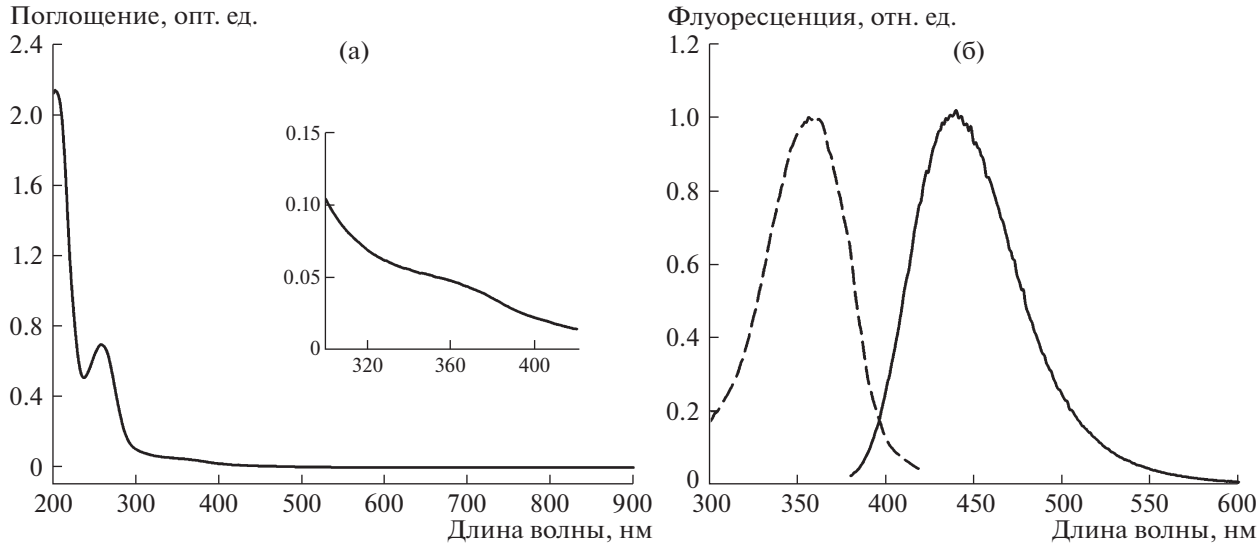


Рис. 2. Спектр поглощения (а) и спектры возбуждения и флуоресценции (б) концентрата низкомолекулярных соединений, содержащего стимулятор свечения гриба *N. nambi*. На вставке приведен фрагмент спектра поглощения в диапазоне 300–420 нм. В спектрах возбуждения и флуоресценции значения нормированы на максимальные уровни световой эмиссии.

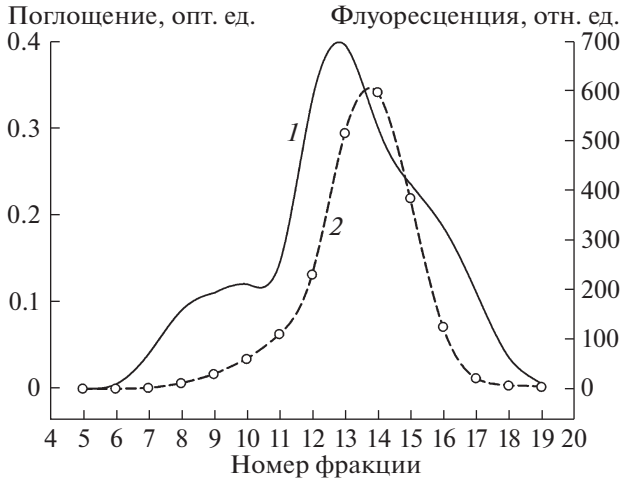


Рис. 3. Гель-фильтрационная хроматография концентрата низкомолекулярных компонентов из мицелия *N. nambi* на колонке с Bio-Gel P2: *1* – профиль элюции, *2* – уровень флуоресценции хроматографических фракций.

свечение пеллет мицелия *N. nambi* проводили, как изложено выше, добавляя в тестируемые пробы одинаковые объемы (5 мкл) концентратов.

В сравнительных экспериментах мы установили, что сконцентрированный образец 2 обладал гораздо большим стимулирующим свечение мицелия *N. nambi* эффектом, по сравнению с образцами 1 и 3 (рис. 4). Это следует из анализа максимального уровня свечения пеллет, стимулированного добавлением образцов, и площади под кривыми регистрируемых люминесцентных сигналов, отражающей суммарный квантовый выход реакции (рис. 4).

Из расчетов площадей под кривыми люминесцентных сигналов при стимуляции свечения пеллет *N. nambi* образцами 1, 2 и 3 соотношение квантовых выходов составило 2 : 11 : 0.5 соответственно. Совокупность этих данных позволяет с достаточной уверенностью полагать, что обнаруженный нами стимулятор свечения является флуоресцентным соединением.

По предварительным данным гель-фильтрационной хроматографии на колонке с Bio-Gel P2 кажущаяся молекулярная масса стимулятора, рассчитанная нами из максимума пика флуорес-

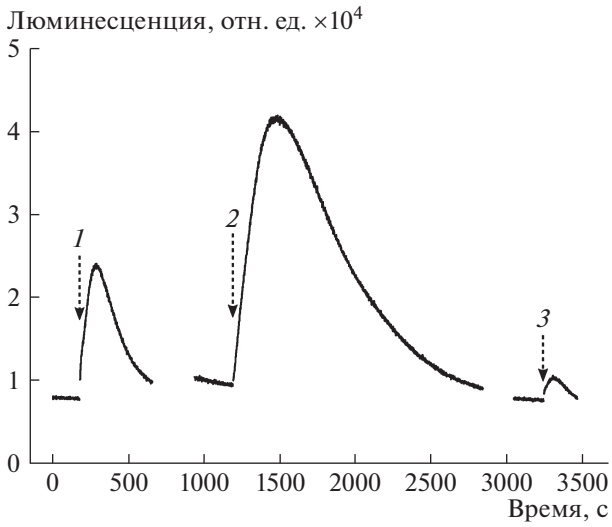


Рис. 4. Стимуляция свечения пеллет мицелия *N. nambi* образцами объединенных и сконцентрированных хроматографических фракций, находящихся на подъеме (1), в максимуме (2) и на спаде (3) флуоресцентного пика (см. рис. 3). Стрелками показаны моменты добавления образцов (по 5 мкл) к пеллетам.

ценции (рис. 3), по данным нескольких экспериментов находится в диапазоне 0.4–0.6 кДа.

В исследованиях мы установили, что компонент, стимулирующий свечение пеллет мицелия *N. nambi*, не является субстратом (или его предшественником) люминесцентной системы, выделенной из данного гриба. По крайней мере после добавки 5 мкл содержащих стимулятор концентрата низкомолекулярных соединений и сконцентрированного после его хроматографии образца 2 к активированной НАДФН люминесцентной системе мы не наблюдали изменений в уровне ее световой эмиссии.

Таким образом, в экстрактах из мицелия светящегося гриба *Neonothopanus nambi* после обработки β-глюкозидазой обнаружен стимулятор грибного свечения. Установлено, что стимулятор свечения является низкомолекулярным, термостабильным соединением и при добавках к пеллетам светящегося мицелия увеличивает уровень их световой эмиссии от нескольких раз до 1.5 порядков и более. Результаты экспериментов свидетельствуют в пользу того, что обнаруженный компонент является флуоресцентным соединением и при возбуждении длинами волн 350–370 нм обладает синей флуоресценцией с максимумом световой эмиссии 440 нм. Установлено, что стимулятор свечения не является субстратом (или предшественником субстрата) люминесцентной системы гриба *N. nambi*. Механизм стимуляции свечения обнаруженным компонентом пока непонятен и требует дальнейшего изучения. Приоритетной ближайшей задачей дальнейших исследований будет являться выделение обнаруженного компонента в чистом виде для установления его структуры и механизма стимулирующего свечение эффекта.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны к.б.н. Н.В. Псурцевой, зав. лабораторией биохимии грибов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург), за предоставление для исследований культуры гриба *N. nambi*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mogilnaya O.A., Ronzhin N.O., Bondar V.S.* Estimating Levels of Light Emission and Extracellular Peroxidase Activity of Mycelium of Luminous Fungus *Neonothopanus nambi* Treated with β-glucosidase // Curr. Res. Environ. Appl. Mycol. 2018. V. 8. P. 75–85.
2. *Бондарь В.С., Пузырь А.П., Пуртов К.В., и др.* Выделение люминесцентной системы из светящегося гриба *Neonothopanus nambi* // ДАН. 2014. Т. 455. № 3. С. 346–348.
3. *Purtov K.V., Petushkov V.N., Baranov M.S., et al.* The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. V. 54. P. 8124–8128.
4. *Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., et al.* Mechanism and Color Modulation of Fungal Bioluminescence // Sci. Adv. 2017. V. 3. P. e1602847.
5. *Oba Y., Suzuki Y., Martins G.N.R., et al.* Identification of Hispidin as a Bioluminescent Active Compound and Its Recycling Biosynthesis in the Luminous Fungal Fruiting Body // Photochem. Photobiol. Sci. 2017. V. 16. P. 1435–1440.
6. *Teranishi K.* Bioluminescence and Chemiluminescence Abilities of Trans-3-Hydroxyhispidin on the Luminous Fungus *Mycena chlorophos* // Luminescence. 2018. V. 33. P. 1235–1242.
7. *Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., et al.* A genetically encodable bioluminescent system from fungi // PNAS. 2018. V. 115. P. 12728–12732.
8. *Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., et al.* Fungal Light Emitter: Understanding Its Chemical Nature and pH-Dependent Emission in Water Solution // J. Org. Chem. 2020. V. 85. P. 5503–5510.
9. *Airth R.L., McElroy W.D.* Light Emission from Extracts of Luminous Fungi // J. Bacteriol. 1959. V. 77. P. 249–250.
10. *Airth R.L., Foerster G.E.* The Isolation of Catalytic Components Required for Cell-free Fungal Bioluminescence // Arch. Biochem. Biophys. 1962. V. 97. P. 567–573.

FINDING THE LIGHT EMISSION STIMULATOR OF *Neonothopanus nambi* BASIDIOMYCETE AND STUDYING ITS PROPERTIES

N. O. Ronzhin[a,#], E. D. Posokhina[a], O. A. Mogilnaya[a], and V. S. Bondar[a]

[a] *Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[#] *e-mail: roniol@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendji

A stimulator of light emission of the fungus has been found in an aqueous extract from mycelium of the luminous basidiomycete *Neonothopanus nambi* after its treatment with β-glucosidase. The addition of the extract to the luminous mycelium increases the level of light emission from several times to 1.5 orders of magnitude or more. The luminescence stimulator is a low molecular weight thermostable compound: it is detected in the permeate after filtering the extract through a 10 kDa cutoff membrane and it retains the stimulating effect after heat treatment at 100°C for 5 min. In the absorption spectrum of the aqueous sample of the stimulator, two main peaks are observed in the shortwave region (205 and 260 nm) and a shoulder can be seen in the range of 350–370 nm. The luminescence stimulator exhibits blue fluorescence with an emission maximum of 440 nm when excited at 360 nm. It has been established that the luminescence-stimulating component is not a substrate (or its precursor) of the luminescent system of the *N. nambi* fungus.

Keywords: bioluminescence, *Neonothopanus nambi*, luminescent mycelium, light emission stimulator, fluorescence

EDN: FZGMMF
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 183–188

УДК 576.356.2:539.1.047

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПРОРОСТКОВ *Allium cepa* В ДЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

© 2022 г. А. Я. Болсуновский[1,*], Е. А. Трофимова[1], А. В. Зуева[1], Д. В. Дементьев[1], М. В. Петриченков[2]

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи
Поступило 26.11.2021 г.
После доработки 21.12.2021 г.
Принято к публикации 21.12.2021 г.

Исследовали влияние γ-излучения на цитогенетические и ростовые параметры проростков *Allium cepa* L. спустя длительное время после облучения в диапазоне поглощенных доз от 1.0 до 10.7 Гр. Наиболее чувствительным параметром к γ-излучению является частота хромосомных нарушений в клетках, которая возрастала сразу после облучения при всех дозах. В период восстановления после облучения (длительностью до 216 ч) частота хромосомных аберраций закономерно снижалась, но оставалась выше контроля при максимальных дозах облучения в конце эксперимента. Обсуждается влияние начального уровня хромосомных нарушений на ингибирование роста корней лука в длительный период после прекращения облучения.

Ключевые слова: Allium-тест, проростки семян, гамма-облучение, хромосомные нарушения, период восстановления, ингибирование

DOI: 10.31857/S2686738922020044

Испытания ядерного оружия и деятельность предприятий ядерно-топливного цикла привели к поступлению в окружающую среду значительного количества техногенных радионуклидов. Гидробионты реки Енисей испытывают дополнительную дозовую нагрузку за счет техногенных радионуклидов, в том числе в виде радиоактивных микрочастиц, в результате многолетних производственных сбросов Горно-химического комбината ГК Росатом в реку [1–4]. Ранее нами были проведены лабораторные эксперименты с различными биотестами по моделированию влияния γ-излучения радиоактивных частиц и показана высокая чувствительность биотестов к γ-излучению [3, 5–7].

В токсикологических экспериментах нами был использован луковый биотест (*Allium*-test) [6, 7], хорошо зарекомендовавший себя при оценке токсичности проб окружающей среды [8–11]. Для проростков семян лука было обнаружено увеличение частоты цитогенетических нарушений в клетках при всех дозах γ-облучения длительностью 24 ч, включая малые дозы [6]. При максимальной поглощенной дозе 13 Гр хромосомные аберрации были отмечены в большинстве клеток лука на стадии анафазы и телофазы митоза, возросло число клеток с множественными нарушениями. Ранее авторы отмечали, что повреждения ДНК в клетках живых организмов могут привести к остановке их роста, а также к долговременным последствиям [12]. Однако в наших опытах при высоком уровне хромосомных аберраций влияния радиации на рост корней выявлено не было [6]. Отсутствие угнетения ростовых процессов можно объяснить как относительно низкими дозами γ-облучения, так и небольшой длительностью наших экспериментов (24 ч) [6]. В публикациях ряда авторов регистрировали угнетение ростовых параметров растений после облучения, но при этом использовали высокие дозы [12–15]. Так, в обзоре Гудкова (Gudkov) и соавт. [12] эффекты ингибирования роста растений наблюдали при дозах облучения от 5 до 50 Гр и выше, в работе Лю (Liu) и соавт. [15] угнетение роста корней пшеницы отмечены при дозах выше 30 Гр. При этом многие авторы работ не

[1]*Институт биофизики Федерального исследовательского центра "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", Красноярск, Россия*
[2]*Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*
**e-mail: radecol@ibp.ru*

приводят механизмы ингибирования роста облученных растений. В работе Зака (Zaka) и соавт. [16] при облучении проростков гороха (дозы до 10 Гр) отмечены ингибирующие эффекты роста растений, которые регистрируются через несколько поколений. По мнению авторов, ингибирование роста растений во втором поколении объясняется индуцированной облучением геномной нестабильностью [16]. При этом авторы приводят данные по уровням цитогенетических нарушений только в начальный момент роста растений (0 и 20 ч после облучения). Для объективной оценки долгосрочных эффектов γ-облучения в экспериментах необходимы длительные наблюдения не только за ростовыми, но и цитогенетическими параметрами проростков лука после облучения.

Цель настоящей работы – оценить влияние γ-излучения на цитогенетические и ростовые параметры проростков лука *Allium cepa* L. спустя длительное время после облучения.

В эксперименте использовали семена репчатого лука (*Allium cepa* L.) ($2n = 16$) сорта “Штутгартер ризен”. Семена хранили при температуре 4°C в коммерческой упаковке до их использования в экспериментах. Семена проращивали в пластиковых контейнерах на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, в темноте при комнатной температуре. Для облучения использовали проростки длиной 2–3 мм, от 11 до 130 штук, в зависимости от эксперимента, на каждый дозовый уровень. Облучение проводили в течение 24 ч точечным источником, находящимся в стальной капсуле и содержащим ^{137}Cs (активностью 14 ГБк на момент экспериментов) в Институте ядерной физики имени Г.И. Будкера СО РАН (Новосибирск). Значения мощности дозы определялись расстоянием проростков от источника и были проверены прямыми измерениями дозиметрами (ДКГ-02У, НПП “Доза”, Россия и ДКС-АТ1123, “Атомтех”, Белоруссия). Было проведено 2 эксперимента: в Эксперименте № 1 проростки семян лука после облучения длительностью 24 ч дополнительно подращивали 24 ч без облучения; в Эксперименте № 2 проростки лука после облучения длительностью 24 ч дополнительно подращивали без облучения 24, 72, 120, 216 ч. В Эксперименте № 1 растения облучали на трех дозовых уровнях, где поглощенная доза составила 1.0, 2.6 и 5.2 Гр. В Эксперименте № 2 растения облучали на четырех дозовых уровнях, где поглощенная доза составила 1.0, 2.6, 5.2 и 10.7 Гр. Выбор доз облучения был основан на ранее полученной дозовой зависимости для цитогенетических нарушений *Allium cepa* [6]. Поглощенная доза для контрольных растений составила 10^{-4} Гр.

В качестве индикаторов радиационного повреждения использовали следующие параметры: длина корней и доля аномальных клеток с различными типами нарушений на стадии ана-телофазы митоза. Учет цитогенетических параметров проводили при помощи светового микроскопа (Olympus CX31) на давленных препаратах, приготовленных стандартным методом [6]. Для учета аберрантных клеток было просмотрено от 11 до 26 препаратов на каждый уровень облучения. Отмечались следующие типы аномалий: фрагменты, мосты, блуждающие хромосомы, множественные нарушения (наличие в клетке нескольких нарушений разных типов) и прочее. Частоту хромосомных аберраций рассчитывали как отношение числа клеток с нарушениями к общему числу ана-телофазных клеток.

Статистический анализ и визуализацию полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Office Excel 2013 и PAST 3.23. Для сравнения облученных образцов с контролем, а также для выявления различий между образцами, фиксированными сразу и потом, использовали тест Краскела–Уоллиса с парным сравнением совокупностей при помощи критерия Данна с коррекцией по Бонферрони. На рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

В эксперименте № 1 после 24 ч облучения наблюдали увеличение частоты хромосомных аберраций (почти до 100%) в клетках проростков семян лука по сравнению с контролем (рис. 1а). И этот эффект наблюдался при всех использованных дозах. При этом достоверного угнетения роста корня при облучении не отмечено (рис. 1б), несмотря на некоторое снижение средней длины корня при максимальной дозе 5.2 Гр до 8.7 мм по сравнению с длиной корня в контроле (11 мм).

При восстановительном периоде в 24 ч наблюдали снижение частоты хромосомных аберраций при всех дозах почти в 2 раза. Так, при максимальной дозе 5.2 Гр частота аберраций уменьшилась с $96 \pm 2\%$ до $56 \pm 4\%$, при дозе 2.6 Гр – с $59 \pm 3\%$ до $24 \pm 2\%$ (рис. 1а). При этом спектр хромосомных аберраций в период восстановления не менялся по сравнению с периодом облучения – продолжали доминировать множественные нарушения и фрагменты. После облучения снижение частоты хромосомных аберраций в основном происходило за счет уменьшения доли множественных нарушений.

Несмотря на снижение уровня цитогенетических нарушений в 24-часовой восстановительный период, было зарегистрировано угнетение роста корней при дозах 2.6 и 5.2 Гр до 14 мм (рис. 1б) по сравнению со средней длиной корня в контроле (18.3 мм). Вероятно, влияние γ-облучения на ростовые процессы имеет инерционный характер по сравнению с цитогенетическими нарушениями.

В эксперименте № 2, в отличие от эксперимента № 1, был увеличен максимальный уровень дозы γ-облучения до 10.7 Гр и возросла длительность эксперимента с 48 до 240 ч, т.е. существенно увеличился период восстановления растений после облучения. Несмотря на двукратное увеличение максимальной дозы облучения, в эксперименте № 2 также, как и в эксперименте № 1 после 24 ч облучения отмечали рост частоты хромосомных аберраций с увеличением дозы и отсутствие угнетения роста корня при всех использованных дозах (рис. 2а, 2б).

При восстановительном периоде 24 ч, как и в Эксперименте № 1, также наблюдали снижение частоты хромосомных аберраций при всех дозах. Однако степень снижения отличалась при разных дозах облучения: при максимальной дозе 10.7 Гр частота аберраций уменьшилась незначительно с 96 ± 3% до 75 ± 2%, при дозе 5.2 Гр частота аберраций уменьшилась с 96 ± 1% до 53 ± 4%, при дозе 2.6 Гр – с 67 ± 3% до 24 ± 2% (рис. 2а). При более длительном периоде восстановления (более 24 ч) частота хромосомных аберраций продолжала снижаться, но даже на 144–240 ч опыта при дозах 5.2 и 10.7 Гр уровень цитогенетических нарушений в новых поколениях клеток был выше контрольного (рис. 2а). Клеточный цикл меристематических клеток лука занимает порядка 23 ч, из которых 4 ч приходятся на митоз [17]. Следовательно, в нашем эксперименте не наблюдается полной репарации поврежденных хромосом в клетках спустя 6–10 поколений после облучения. Следует отметить, что спектр хромосомных аберраций в начальный период восстановления и до 96 ч опыта не меняется по сравнению с периодом облучения – продолжали доминировать множественные нарушения и фрагменты. В этот период восстановления снижение частоты хромосомных аберраций в основном происходило за счет уменьшения доли множественных нарушений. Начиная с 144 ч опыта в спектре хромосомных нарушений увеличивается доля таких нарушений, как мосты, которые в общей частоте могли доминировать при максимальных дозах облучения.

В Эксперименте № 2, аналогично данным Эксперимента № 1, в 24-часовой восстановительный период после окончания облучения зарегистрировали угнетение роста корней при максимальных дозах 5.2 и 10.7 Гр до 7.2 мм (рис. 2б) по сравнению со средней длиной корня в контроле (10.7 мм). С увеличением времени восстановления (более 24 ч) угнетение роста корней отмечается не только при максимальных дозах облучения, но и при других дозах: угнетение при дозе 2.6 Гр начинается с 96 ч, при дозе 1 Гр начинается с 144 ч эксперимента. Для описания роста корней при облучении и в контроле хорошо подходит линейное уравнение ($l = l_0 + vt$) с высокими коэффициентами детерминации ($R^2 = 0.93–0.99$) (рис. 2б, табл. 1).

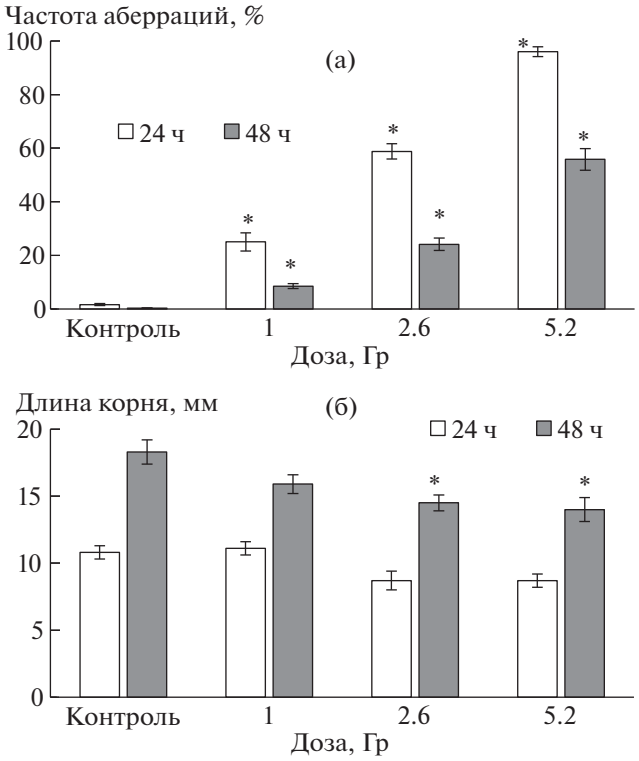


Рис. 1. Влияние разных доз γ-облучения в эксперименте № 1 на частоту хромосомных аберраций (а) в клетках проростков семян лука и среднюю длину корня (б) сразу после облучения (24 ч) и после подращивания растений без облучения (48 ч). * Статистически значимое отличие от контрольного уровня ($p < 0.05$).

Линейная модель характеризует вегетативный рост облученных и контрольных проростков лука как процесс, длящийся во времени с постоянной скоростью (параметр модели – v). Как следует из данных табл. 1, скорость роста корней при максимальных дозах 5.2 Гр и 10.7 Гр в 2–5 раз меньше скорости роста корней в контроле. При этом скорости роста корней при облучении дозами 1 и 2.6 Гр не отличаются между собой, но отличаются от контроля не более чем на 20%. Из данных рис. 2б следует, что отличия в скорости роста корней для разных доз облучения и в контроле сфор-

Таблица 1. Коэффициенты уравнений линейного роста корней $l = l_0 + vt$ при разных дозах облучения

	v	l_0	R^2
Контроль	0.215	2.4	0.97
1 Гр	0.183	2.6	0.97
2.6 Гр	0.167	2.9	0.99
5.2 Гр	0.108	3.4	0.98
10.7 Гр	0.045	3.8	0.93

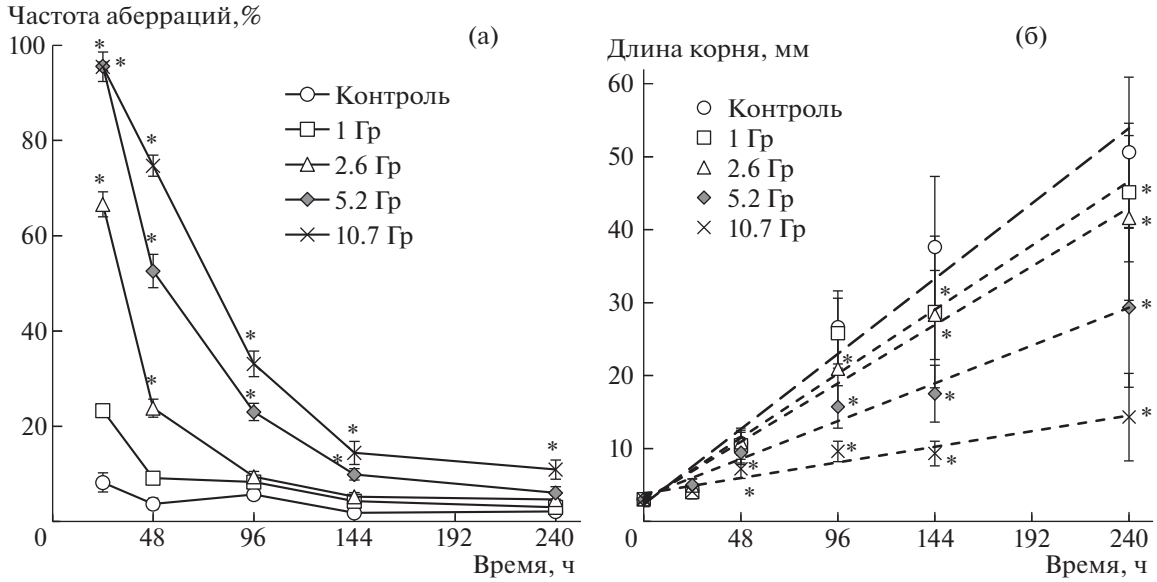


Рис. 2. Влияние разных доз γ-облучения в Эксперименте № 2 на частоту хромосомных аберраций (а) в клетках проростков семян лука и среднюю длину корня (б) сразу после облучения (24 ч) и после подращивания растений без облучения. Штриховые линии – уравнения линейной аппроксимации (табл. 1). * Статистически значимое отличие от контрольного уровня ($p < 0.05$).

мировались в начальный период эксперимента – 24 или 48 ч. Что же такого произошло с корнями в этот начальный период (24–48 ч)? В этот период мы регистрировали максимальные значения хромосомных нарушений (рис. 1а и 2а) в клетках (67–96% на 24 ч опыта и 24–75% на 48 ч эксперимента – первый период восстановления) при облучении дозами от 2.6 до 10.7 Гр. Тогда возможно существует пороговый уровень хромосомных нарушений, который приводит к последующему угнетению роста корней. Из полученных нами экспериментальных данных можно предположить, что величина возможного порогового уровня не превышает 24 ± 2%. При такой минимальной частоте хромосомных аберраций в Эксперименте № 2 наблюдалось угнетение роста корней при дозе облучения 1 Гр (рис. 2б) спустя 144 ч эксперимента (120 ч после облучения). В Эксперименте № 1 ингибирование роста корней отмечали спустя 48 ч опыта при дозе 2.6 Гр и интервале частоты хромосомных нарушений 24–59% (рис. 1). Это дополнительно свидетельствует о пороговом уровне, не превышающем 24 ± 2%.

В обзорах [12, 13] отмечали многочисленные случаи ингибирования и стимулирования ростовых параметров растений после облучения высокими дозами. В исследовании авторов [14] корни проростков лука, выращенные из семян, облученных в дозах 10, 20, 80 и 100 крад, оказались более чувствительны к действию радиации, чем ростки. В исследовании Лю (Liu) и соавт. [15] семена пшеницы облучали тяжелыми ионами углерода и диапазон использованных доз был от 10 до 200 Гр. Авторы [15] отмечали угнетение выросших корней пшеницы спустя 3 сут при облучении дозами выше 30 Гр и спустя 7 сут при облучении дозами выше 60 Гр. В наших экспериментах (рис. 1 и 2) регистрировали угнетение роста корней лука спустя несколько суток после γ-облучения очень низкими дозами, начиная с 1.0 Гр. В работе Вайяпуркар (Vaijapurkar) и соавт. [9] наблюдали изменения ростовых параметров головок лука (*Allium cepa*) спустя 5 дней после облучения высокими дозами (более 5 Гр), в то время как разница цитогенетических параметров (митотический индекс и число микроядер) с контролем проявилась спустя 2 сут при более низких дозах 2–4 Гр. В отдельных работах наблюдаемые эффекты ингибирования ростовых параметров растений после облучения объяснялись цитогенетическими нарушениями и повреждениями ДНК [12, 16]. Известно, что цитогенетические нарушения являются одним из самых чувствительных параметров γ-облучения и возникают практически сразу после облучения. И поэтому в работе [16] ингибирование роста облученных проростков гороха (дозы до 10 Гр) во втором поколении объясняется индуцированной облучением геномной нестабильностью растений. Однако авторы этой работы не приводят данные по уровням цитогенетических нарушений для ингибирования роста растений.

В обзоре [12] констатируется, что повреждения молекул ДНК являются одной из главных причин гибели живых организмов после облучения. Образующиеся в результате облучения одно- и двунитевые разрывы ДНК могут восстанавливаться,

однако в результате репарации возникают ошибки, которые могут привести к изменениям в регуляции генома. В предыдущей нашей работе [18] проведена оценка повреждений ядерной ДНК проростков лука методом ДНК-комет и показано увеличение повреждений ДНК в диапазоне доз γ-облучения от 0.02 до 5 Гр по сравнению с контролем. Для дозовой зависимости параметра повреждений ДНК отмечен нелинейный характер: линейный участок в области малых доз и дозонезависимое плато в диапазоне доз от 1 до 5 Гр [18]. Возможно, что при низких дозах облучения клетки могут эффективно репарировать возникающие разрывы ДНК. При этом наличие нерепарированных двунитевых разрывов ДНК с увеличением дозы облучения может приводить к запуску клеточной гибели [12]. И поэтому пороговый уровень накопленных хромосомных нарушений в клетках лука, предложенный выше для объяснения ингибирования роста корней, очевидно, определяется степенью повреждений ДНК. Изменения генома клетки в результате накопленных хромосомных нарушений (хромосомная нестабильность) после облучения приводят в дальнейшем к угнетению ростовых процессов корней. Как следует из полученных нами данных, повреждения хромосом после окончания облучения регистрируются в клетках даже спустя 6–10 поколений и при этом наблюдается угнетение роста корней (рис. 2).

Таким образом, используемый нами луковый биотест на основе проростков *Allium cepa* впервые показал увеличение как общей частоты хромосомных нарушений клеток в анафазе и телофазе, так и ингибирование роста корней после γ-облучения в диапазоне доз от 1.0 до 10.7 Гр. При этом максимальный отклик параметров облученных растений регистрировали в разное время восстановительного периода: максимум частоты хромосомных нарушений отмечен в первые 24 ч после облучения; максимум угнетения длины корней – спустя 216 ч после облучения. Регистрация повреждений хромосом в клетках лука (в длительный период после прекращения облучения) позволяет считать хромосомную нестабильность основной причиной угнетения роста корней. Полученные данные позволяют использовать биотест *Allium cepa* для оценки долгосрочных последствий действия γ-излучения в течение жизненного цикла растения либо в последующих поколениях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vakulovsky S.M., Kryshev I.I., Nikitin A.I., Savitsky Y.V., Malyshev S.U., Tertyshnik E.G.* Radioactive contamination of the Yenisey River // Journal of Environmental Radioactivity. 1995. V. 29. P. 225–236.
2. *Сухоруков Ф.В., Дегерменджи А.Г., Белолипецкий В.М. и др.* Закономерности распределения и миграции радионуклидов в долине реки Енисей. Новосибирск, Изд-во СО РАН. Филиал “Гео”. 2004. 286 с. [*Sukhorukov F.V., Degermendzhi A.G., Belolipetskii V.M. et al.* Distribution and Migration of Radionuclides in the Yenisei River Valley (Izd-vo SO RAN, “Geo” Branch, Novosibirsk, 2004) (in Russian)].
3. *Bolsunovsky A., Melgunov M.* Radioactive particles in the Yenisei River floodplain (Russia): characterization, leaching and potential effects in the environment // Journal of Environmental Radioactivity. 2019. V. 208–209. № 105991. P. 1–8.
4. *Bolsunovsky A., Dementyev D., Trofimova E.* Biomonitoring of radioactive contamination of the Yenisei River using aquatic plants // Journal of Environmental Radioactivity. 2020. V. 211. Art. No. 106100.
5. *Bolsunovsky A., Frolova T., Dementyev D., Sinitsyna O.* Low doses of gamma-radiation induce SOS response and increase mutation frequency in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cells // Ecotoxicol. and Environ. Safety. 2016. V. 134. P. 233–238.
6. *Bolsunovsky A., Dementyev D., Trofimova E., et al.* Chromosomal aberrations and micronuclei induced in onion (*Allium cepa*) by gamma-radiation // Journal of Environmental Radioactivity. 2019. V. 207. P. 1–6.
7. *Трофимова Е.А., Дементьев Д.В., Болсуновский А.Я.* Влияние γ-излучения на развитие растений из облученных семян и проростков *Allium cepa* L. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 3. С. 293–299. [*Trofimova E.A., Dementyev D.V., Bolsunovsky A.Ya. The* Effect of γ-Rays on the Development of Plants from Irradiated Seeds and Seedlings of *Allium cepa* L. // Radiation biology. Radioecology. 2019. V. 59. № 3. P. 293–299. (in Russian)].
8. *Fiskesjo G.* The Allium test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. 1985. V. 102. P. 99–112.
9. *Vaijapurkar S.G., Agarwal D., Chaudhuri S.K., et al.* Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose // Radiation measurements. 2001. V. 33. № 5. P. 833–836.
10. *Leme D.M., Marin-Morales M.A. Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2009. V. 682. № 1. P. 71–81.
11. *Geras'kin S., Oudalova A., Michalik B., Dikareva N., Dikarev V.* Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of Allium-test // Chemosphere. 2011. V. 83. P. 1133–1146.
12. *Gudkov S.V., Grinberg M.A., Sukhov V., Vodeneev V.* Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants // Journal of Environmental Radioactivity. 2019. V. 202. P. 8–24.
13. *Jan S., Parween T., Siddiqi T.O., Mahmooduzzafar.* Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products // Environ. Rev. 2012. V. 20. P. 17–39.
14. *Amjad M., Anjum M.A.* Effect of gamma radiation on onion seed viability, germination potential, seedling

growth and morphology // Pak. J. Agric. Sci. 2002. 39 (3). P. 202–206.

15. *Liu Qingfang, Wang Zhuanzi, Zhou Libin, et al.* Relationship between plant growth and cytological effect in root apical meristem after exposure of wheat dry seeds to carbon ion beams // Nuclear instruments and method in physics research. 2013. B 305. P. 9–15.
16. *Zaka R., Chenal C., Misset M.T.* Study of external low irradiation dose effects on induction of chromosome aberrations in *Pisum sativum* root tip meristem // Mutation Research /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2002. V. 517. № 1–2. P. 87–99.
17. *Matagne R.* Chromosomal aberrations induced by dialkylating agents in *Allium cepa* root-tips and their relation to the mitotic cycle and DNA synthesis // Radiation Botany. 1968. V. 8. № 6. 489–497.
18. *Bolsunovsky A.Ya., Dementyev D.V., Frolova T.S., et al.* Effects of gamma-radiation on DNA damage in onion (*Allium cepa* L.) seedlings // Doklady Biochemistry and Biophysics, 2019, V. 489. issue 1. P. 362–366.

EFFECT OF GAMMA RADIATION ON CYTOGENETIC AND GROWTH ENDPOINTS OF *ALLIUM CEPA* SEEDLINGS IN LONG-TERM EXPERIMENTS

A. Ya. Bolsunovsky[a,#], E. A. Trofimova[a], A. V. Zueva[a], D. V. Dementyev[a], and M. V. Petrichenkov[b]

[a] *Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Krasnoyarsk, Russian Federation*

[b] *Budker Institute of Nuclear Physics of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation*

[#] *e-mail: radecol@ibp.ru*

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendji

The effect of γ-radiation on the cytogenetic and growth endpointsof *Allium cepa* L. seedlings in a long period after irradiation in absorbed doses from 1.0 to 10.7 Gy was examined. The most sensitive to the radiation was the chromosome aberrations rate that increased immediately after exposure in all doses experienced. In the recovery period (up to 216 hours), following the irradiation, the chromosome aberration frequency consistently decreased but at the end of experiment at maximum doses, it remained above the control values. The impact of the initial level of chromosome abnormalities on the inhibition of onion roots growth in a long term after irradiation was discussed.

Keywords: Allium-test, seedlings, gamma irradiation, chromosome aberrations, recovery time, inhibition

EDN: GPHOHJ
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 189–191

УДК 577.2

СРЕДИ АНТИТЕЛОПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ, МОНОБОДИ, СПОСОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С НУКЛЕОКАПСИДНЫМ БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-COV, ЕСТЬ МОНОБОДИ С ВЫСОКИМ СРОДСТВОМ К НУКЛЕОКАПСИДНОМУ БЕЛКУ ВИРУСА SARS-CoV-2

© 2022 г. Ю. В. Храмцов[1], А. В. Уласов[1], Т. Н. Лупанова[1],
академик РАН Г. П. Георгиев[1], член-корреспондент РАН А. С. Соболев[1,2,*]

Поступило 27.10.2021 г.
После доработки 21.12.2021 г.
Принято к публикации 21.12.2021 г.

Из литературных данных взяты семь аминокислотных последовательностей антителоподобных молекул, монободи, способных взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV. Методом синтеза гена получены нуклеотидные последовательности генов монободи, которые были проэкспрессированы в *E. coli* и выделены, используя Ni-NTA хроматографию. Методом термофореза было показано, что три из семи выбранных антителоподобных молекул могут с высоким сродством (константа диссоциации десятки нМ) взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2. Для оставшихся четырех монободи было обнаружено только низкоаффинное связывание с константой диссоциации в несколько мкМ.

Ключевые слова: SARS-CoV, SARS-CoV-2, нуклеокапсидный белок, антителоподобные молекулы, монободи, термофорез

DOI: 10.31857/S2686738922020111

Пандемия коронавируса SARS-CoV-2 продемонстрировала актуальность разработки новых противовирусных препаратов. Классические ингибиторы вирусной активности представляют собой низкомолекулярные соединения, способные встраиваться в полости вирусных белков [1]. Однако, когда вирусные белки не имеют таких полостей, то к ним тяжело подобрать эффективный ингибитор. Напротив, антитела с высокой специфичностью и аффинностью можно получить для практически любого белкового антигена. Более того, это не обязательно должны быть природные антитела, но различные подобные антителам молекулы, обладающие помимо нужной специфичности и аффиности значительно меньшим, по сравнению с природными антителами, размером [2]. Для вируса SARS-CoV-2 потенциальной вирусной мишенью может быть нуклеокапсидный белок, или N-белок. Он связывается с вирусной РНК и принимает активное участие в сборке и упаковке вируса [3, 4], а также имеет целый ряд других важных для вируса функций, таких, например, как репликация и транскрипция вирусной РНК [5]. Учитывая, что гомология N-белков для вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV составляет более 90% [6], антителоподобные молекулы, способные взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV, теоретически могут взаимодействовать и с N-белком вируса SARS-CoV-2. Однако гомология не все определяет в данном вопросе и в каждом конкретном случае это предположение можно проверить только экспериментально. В данной работе мы использовали семь монободи (Fn-N) к N-белку вируса SARS-CoV, антителоподобных молекул, созданных на основе десятого домена фибронектина 3 типа человека [7]. Методом термофореза были определены константы диссоциации комплекса Fn-N и N-белка вируса SARS-CoV-2. Обнаружено, что высоким сродством к N-белку обладают только три из данных семи антителоподобных молекул.

Генно-инженерными методами были получены семь плазмид, каждая из которых содержала ген, кодирующий антителоподобную молекулу с His-тагом, а также плазмида, кодирующая N-белок SARS-CoV-2 с His-тагом (ShineGene). Далее, каждой из этих плазмид трансформировался

[1]*Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия*
[2]*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
**e-mail: alsobolev@yandex.ru*

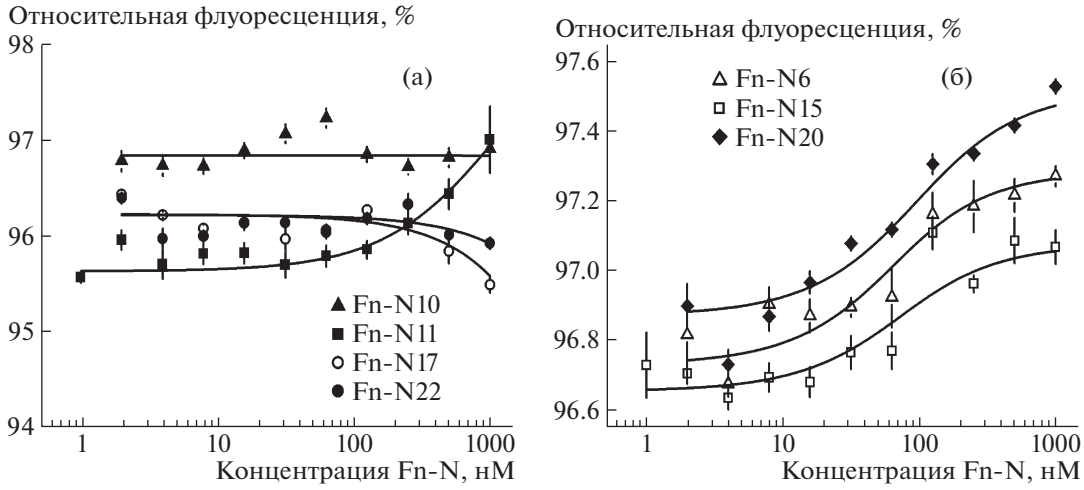


Рис. 1. Зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации Fn–N при постоянной концентрации N-белка (40 нМ) для Fn-N с низким сродством к N-белку (а) и с высоким сродством к N-белку (б). Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной флуоресценции (8–12 повторов).

штамм *E. coli* BL21(DE3). Индукцию экспрессии Fn–N и N-белка проводили 500 мкМ IPTG в течение 20 ч при 16°C для Fn–N и в течение 3 ч при 37°C для N-белка. Fn–N и N-белок выделяли из нерастворимой фракции [8], а затем очищали аффинной хроматографией на носителе Protino® Ni-TED Resin. Выделенные белки хранили в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 8.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученных белков (98.9% для N-белка и 92.1%, 84.7%, 58.1%, 81.9%, 97.2%, 89.1%, 96.7% для Fn–N6, Fn–N10, Fn–N11, Fn–N15, Fn–N17, Fn–N20 и Fn–N22 соответственно). Белок Fn-N11 подвергается частичному гидролизу, что может сказаться на точности определения константы взаимодействия данной антителоподобной молекулы с N-белком.

Взаимодействие Fn-N с N-белком изучалось методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series (“NanoTemper Technologies GmbH”, Германия) в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7. Для предотвращения агрегации антителоподобных молекул в буфер добавляли 70 мМ имидазола. Чтобы исключить адсорбцию N-белка, на используемых в термофорезе капиллярах в буфер добавлялся 0.005–0.01% SDS. N-белок был помечен флуоресцентным красителем ATTO647. Для этого в 65 мМ карбонатном буфере (pH 8.5) к N-белку был добавлен полуторакратный мольный избыток активированного эфира красителя ATTO647 с дальнейшей инкубацией 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. N-белок со связавшимся ATTO647 отделили от свободного красителя на хроматографической колонке PD10. Степень модификации N-белка красителем ATTO647 составила 0.76. Метод термофореза заключается в нагревании инфракрасным лазером части капилляра с образцом и измерения флуоресценции образца [9]. Уровень этой флуоресценции меняется в процессе образования комплекса между антителоподобной молекулой и N-белком.

При фиксированной концентрации N-ATTO647 (40 нМ) методом термофореза были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации Fn–N (рис. 1). Для каждого эксперимента получали четыре таких зависимости, и весь эксперимент повторяли два-три раза. По каждой кривой определялась константа диссоциации комплекса Fn–N с N-белком, ее усредняли по всем 8–12 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Для Fn–N10 не наблюдалось заметного связывания с N-белком (рис. 1а). А для Fn–N11, Fn–N17 и Fn–N22 (рис. 1а) константы диссоциации с N-белком составили 2.7 ± 0.6, 3.0 ± 0.5 и 2.9 ± 0.9 мкМ соответственно. Такие высокие константы диссоциации говорят о неспецифическом взаимодействии указанных монободи с N-белком. Высокоаффинное взаимодействие с N-белком наблюдалось для Fn–N6, Fn–N15 и Fn–N20 (рис. 1б). Для них константы диссоциации с N-белком составили 31 ± 7, 24 ± 4 и 66 ± 12 нМ соответственно.

Таким образом, из семи антителоподобных молекул к N-белку вируса SARS-CoV только три взаимодействуют с высоким сродством с N-белком вируса SARS-CoV-2. Ранее в литературе, основываясь на высокой гомологии N-белка для этих двух вирусов, Du Y. et al. [10] предполагали,

что Fn–N17 и Fn–N22 будут хорошо связываться и с N-белком вируса SARS-CoV-2. Однако полученные нами данные показывают, что это не так и для этих антителоподобных молекул наблюдается только низкоаффинное взаимодействие с N-белком вируса SARS-CoV-2 (рис. 1а). Наилучшим сродством к N-белку обладает антителоподобная молекула Fn–N15. Согласно литературным данным, она взаимодействует с C-концевым доменом N-белка [7]. Для ингибирования взаимодействия N-белка с РНК наибольший интерес представляет Fn–N20, взаимодействующая с N-концевым доменом N-белка [7]. Возможно, именно поэтому в работе 2009 г. для SARS-CoV из этих трех антителоподобных молекул Fn–N20 лучше всего ингибирует наработку как вирусной РНК, так и самих вирусных частиц [7].

В результате проведенной работы нами было продемонстрировано, что три из семи ранее описанных монободи, связывающихся с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV, способны также взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Данные антителоподобные молекулы могут послужить основой для разработки противовирусных препаратов, нацеленных как на SARS-CoV, так и на SARS-CoV-2.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Clercq E.D., Li G.* // Clin Microbiol Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.
2. *Gebauer M., Skerra A.* // Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2020. V. 60. P. 391–415.
3. *Surjit M., Lal S.K.* // Infect Genet Evol. 2008. V. 8. P. 397–405.
4. *Wu C., Zheng, M.* // Preprints. 2020. 2020020247.
5. *Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al.* // Indian J Pharmacol. 2020. V. 52. P. 56.
6. *Tilocca B., Soggiu A., Sanguinetti M., et al.* // Microbes Infect. 2020. V. 22. P. 218–220.
7. *Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al.* // J Biol Chem. 2009. V. 284. P. 17512–17520.
8. *Li G., Li W., Fang X., et al.* // Protein Expr Purif. 2021. V. 186.
9. *Weinken C., Baaske P., Rothbauer U., et al.* // Nat Commun. 2010. V. 1, 100.
10. *Du Y., Zhang T.H., Meng X., et al.* // Preprint. 2020.

AMONG ANTIBODY-LIKE MOLECULES, MONOBODIES, ABLE TO INTERACT WITH NUCLEOCAPSID PROTEIN OF SARS-COV VIRUS, THERE ARE MONOBODIES WITH HIGH AFFINITY TO NUCLEOCAPSID PROTEIN OF SARS-COV-2 VIRUS

Y. V. Khramtsov[a], A. V. Ulasov[a], T. N. Lupanova[a], Academician of the RAS G. P. Georgiev[a], and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev[a,b,#]

[a] *Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

[b] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: alsobolev@yandex.ru*

Seven amino acid sequences of antibody-like molecules, monobodies, capable of interacting with the nucleocapsid protein of the SARS-CoV virus were taken from the literature. Nucleotide sequences of monobodies genes were obtained by gene synthesis, which were expressed in *E. coli* and isolated using Ni-NTA chromatography. It was shown by thermophoresis that three of the seven selected antibody-like molecules can interact with high affinity (dissociation constant of tens of nM) with the nucleocapsid protein of the SARS-CoV-2 virus. For the remaining four monobodies, only low affinity binding with a dissociation constant of several μM was found.

Keywords: SARS-CoV, SARS-CoV-2, nucleocapsid protein, antibody-like molecules, monobody, thermophoresis

EDN: WGDPNW
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 192–196

УДК 612.822.81, 616-001.41, 616.211-089

ВЛИЯНИЕ АНЕСТЕЗИИ НА ПОСЛЕОПЕРАЦИОННУЮ БОЛЬ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ СЕПТОПЛАСТИКИ

© 2022 г. И. К. Калмыков[1,*], Г. М. Мурадов[1], академик РАН И. В. Решетов[2], А. А. Цымбал[2]

Поступило 29.11.2021 г.
После доработки 21.12.2021 г.
Принято к публикации 21.12.2021 г.

Целью исследования являлась оценка острого болевого синдрома, при различной тактике общей анестезии, у пациентов после септопластики. Всем пациентам применялась местная инфильтрационная анестезия 2% раствором прокаина. В 1 группе (95 чел.) использована премедикация 2% раствором промедола и 60 мг кеторолака вечером, во 2 группе (72 чел.) – фентанил, пропофол, цисатракурия безилат, транексамовую кислоту, атропин и метоклопрамид, в 3 группе (89 чел.) – атракурия безилат, тиопентал натрия, закись азота и галотан. Во 2 и 3 группе вечером в день операции внутримышечно использовали 100 мг кетопрофена. Передняя тампонада осуществлялась паролоновыми тампонами в резиновой перчатке. В 1 и 2 группе тампонада удалялась на 2 день, а в 3-й группе – чрез сутки после операции. Болевой синдром оценивался через 1, 3 и 6 ч, 1 и 2 сут после операции. Было выявлено, что схема анестезии во 2 группе наиболее предпочтительна, а тампонаду носа необходима удалять на 2-й день после операции.

Ключевые слова: септопластика, анестезия, аналоговые шкалы, боль
DOI: 10.31857/S268673892202010X

ВВЕДЕНИЕ

Искривление перегородки носа (ИПН) является одной из самых распространенных патологий в оториноларингологии. Хирургическая коррекция ИПН составляет до 40% всех операций в отделениях оториноларингологии [1–3]. Как показано на модели септопластики в эксперименте на крысах, данное хирургическое вмешательство при минимальном анестезиологическом пособии провоцирует развитие реакций дезадаптации [4–6].

Острый болевой синдром после септопластики остается одной из основных проблем [7], несмотря на прогресс в периоперационном обезболивании [8, 9]. Хорошо известно, что адекватная анальгетическая терапия в послеоперационном периоде сокращает продолжительность пребывания в больнице, уменьшает количество осложнений, связанных с острым болевым синдромом [10]. Комбинированные анальгетические методы являются наиболее часто используемыми методами повышения эффективности обезболивания и снижения побочных эффектов и доз применяемых препаратов для анестезии [11, 12]. Передняя тампонада носа дополнительно после септопластики увеличивает интенсивность боли [13]. Септопластика проводится как по местной анестезией, так и под общей анестезией [10, 11]. Однако исследований, оценивающих общую анестезию у пациентов после септопластики, не проводилось.

Цель исследования – изучить влияние анестезии на послеоперационную боль у пациентов после септопластики.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Септопластика была проведена 139 мужчинам и 117 женщинам, в возрасте от 18 до 45 лет. Пациенты случайным образом распределялись по трем группам. В 1 группе (95 чел.) септопластика проводилась под местной анестезией 0.1% раствором эпинефрина и внутримышечно применялся кетаролак (60 мг) в вечернее время (табл. 1).

Во 2 группе (72 пациентов), кроме местной анестезии, использовали фентанил, пропофол, цисатракурия безилат (нимбекс), транексамовую кислоту (транексам), атропин и метоклопрамид (церукал). 89 пациентам 3-й группы в качестве общей анестезии применялись атракурия безилат, тиопентал натрия, закись азота и галотан (фторотан). Всем пациентам 2 и 3 групп в вечер-

[1]*ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*
[2]*ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет (Сеченовский университет), Москва, Россия*
**e-mail: 23kalmykov@gmail.com*

Таблица 1. Средние значения интенсивности острого болевого синдрома после септопластики

шкала	ВАШ, мм	ВШМ, мм	ЦРШ, мм	Среднее по шкалам, мм
1 ч после операции				
1 группа	44.65 ± 3.37	46.65 ± 3.84	48.75 ± 3.85	46.68 ± 3.85
2 группа	17.15 ± 2.47	20.68 ± 2.55	22.47 ± 2.36	20.1 ± 2.4
3 группа	30.75 ± 2.21	42.38 ± 2.68	44.3 ± 3.03	39.17 ± 2.64
3 ч после операции				
1 группа	40.1 ± 3.03	46.75 ± 3.4	43.5 ± 3.33	43.45 ± 3.38
2 группа	21.82 ± 2.83	27.05 ± 2.69	27.47 ± 2.74	25.45 ± 2.7
3 группа	31.21 ± 2.5	43 ± 3.26	46.25 ± 3.32	40.15 ± 2.03
6 ч после операции				
1 группа	34.95 ± 2.74	42.25 ± 3.48	42.5 ± 3.04	39.9 ± 2.94
2 группа	25 ± 3.02	28.34 ± 2.74	29.12 ± 2.68	27.51 ± 2.75
3 группа	27.67 ± 3.35	38.79 ± 2.07	40.42 ± 2.15	35.63 ± 2.19
1 сут после операции				
1 группа	16.65 ± 3.01	21 ± 2.61	26 ± 3.55	21.22 ± 2.32
2 группа	16.64 ± 2.36	19.96 ± 2.27	22.71 ± 1.9	19.77 ± 2.06
3 группа	22.71 ± 3.67	33.08 ± 2.92	37.5 ± 2.32	31.1 ± 2.3
2 сут после операции				
1 группа	3.75 ± 2	4.45 ± 2.1	12.5 ± 1.26	6.9 ± 1.76
2 группа	3.68 ± 1.01	5.68 ± 1.27	12.53 ± 1.04	7.3 ± 1.03
3 группа	3.45 ± 2.5	4.75 ± 2.7	12.5 ± 1.9	6.9 ± 2.37

ние часы в день операции внутримышечно вводили 100 мг кетопрофена (табл. 1). Для передней тампонады носа были взяты поролоновые тампоны в резиновой перчатке. В 1-й и 2-й группах тампоны удаляли через двое суток после операции, а во второй – через сутки. Интенсивность боли после септопластики оценивали с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ), вербальной шкалы-«молнии» (ВШМ) и цифровой рейтинговой шкалы (ЦРШ) (рис. 1) как в раздельности, так и по средним значениям по трем шкалам. Шкалы предлагались пациентам через 1, 3, 6 ч после операции. Через 1 и 2 дня после операции интенсивность боли оценивали через 1 ч после удаления тампонов. Данные обрабатывались в программах Excel 2019, JASP 0.14.0.0.

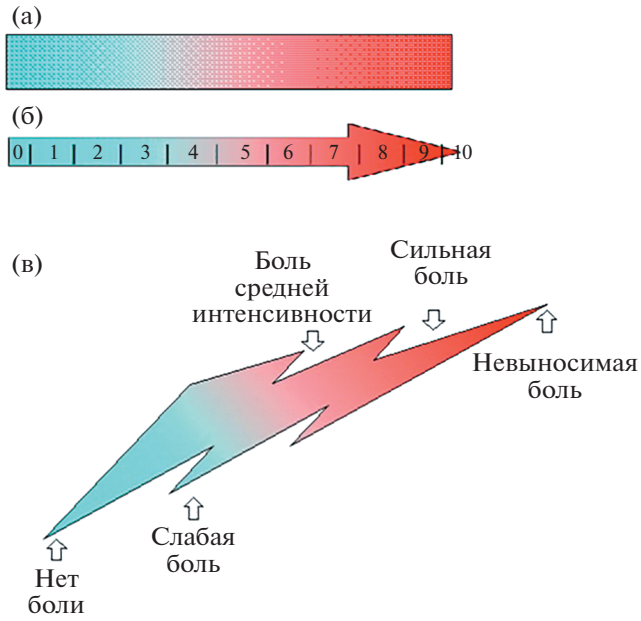


Рис. 1. Аналоговые шкалы для оценки боли: а – ВАШ, б – ЦРШ, в – ВШМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По ВАШ, согласно критерию Манна–Уитни, болевой синдром в течение первых двух часов был достоверно ниже во 2-й группе, по сравнению с остальными ($p < 0.001$) (табл. 1, рис. 2а). В это же время интенсивность острой боли в 1-й группе была достоверно выше, чем в 3-й ($p < 0.01$). Через 6 ч после операции боль в группах с общей анестезией была достоверно ниже, чем в группе с местной анестезией и премедикацией ($p < 0.01$), и не различалась между собой. Через сутки после септопластики выраженность болевого синдрома в первых двух группах была статистически одина-

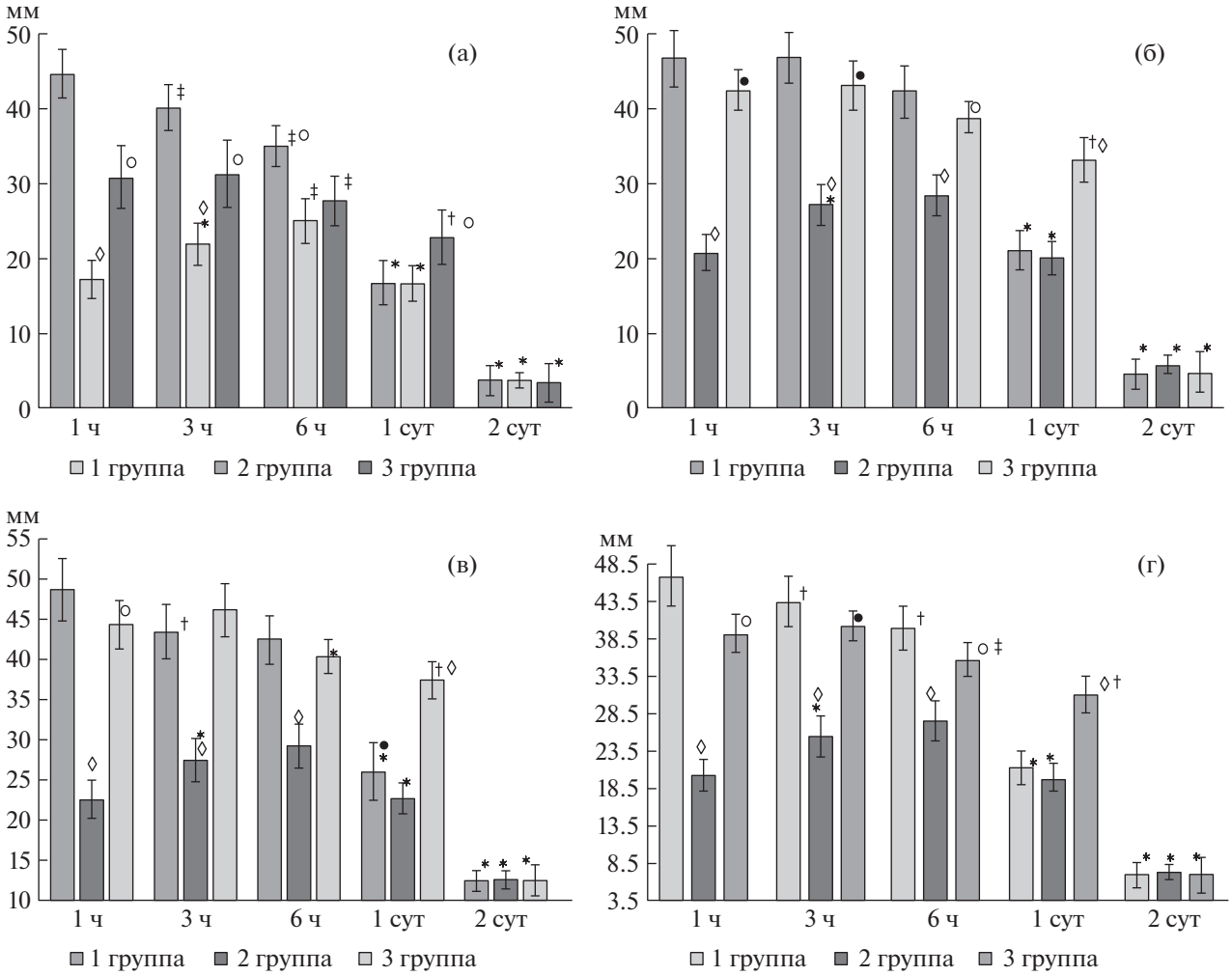


Рис. 2. Сравнение болевого синдрома в группах пациентов с различной анестезиологической тактикой: а – средние показатели болевого синдрома в группах по ВАШ; б – средние показатели болевого синдрома в группах по ВШМ; в – средние показатели болевого синдрома в группах по ЦРШ; д – средние показатели болевого синдрома в группах по трем шкалам. *Примечание*: * – достоверные различия между сроками после операции внутри группы при $p < 0.001$; † – достоверные различия между сроками после операции внутри группы при $p < 0.01$; ‡ – достоверные различия между сроками после операции внутри группы при $p < 0.05$; ◊ – достоверные различия между группами при $p < 0.001$; ° – достоверные различия между группами при $p < 0.01$; • – достоверные различия между группами при $p < 0.05$.

ковой, но при этом в 3-й группе боль была интенсивнее ($p < 0.01$) (табл. 1, рис. 2а). Динамика выраженности острой боли внутри групп была следующей. В 1-й группе был отмечен ее достоверный рост на 3-й ($p < 0.01$) и 6-й ($p < 0.05$) час после операции (табл. 1, рис. 2а). Далее произошло ее достоверное снижение ($p < 0.001$). Наблюдалось постепенное снижение остроты боли в 1 группе через 1 и 3 ч ($p < 0.05$), а также на 1 и 2 сутки после септопластики ($p < 0.001$). У пациентов 3 группы, во ВАШ, снижение болевого синдрома было отмечено лишь через 6 ч после операции ($p < 0.05$) с постепенным ее регрессом.

ВШМ показала практически те же результаты, что и ВАШ. Согласно критерию Стьюдента, во 2-й группе интенсивность боли была достоверно ниже, чем в 1-й и 3-й группах, через 1, 3 и 6 ч после септопластики ($p < 0.001$) (табл. 1, рис. 1б). Боль была значимо ниже в 3-й группе, по сравнению с 1-й группой, на 1-й ($p < 0.05$), 3-й ($p < 0.05$) и 6-й ($p < 0.01$) час после септопластики. Через сутки 1 и 2 группы имели болевой синдром низкой интенсивности, в то время как в 3-й группе пациенты оценивали боль как среднюю ($p < 0.001$). По ВШМ динамика болевого синдрома была аналогична таковой по ВАШ. Однако в обеих группах боль начала снижаться только на 6-й час после операции (табл. 1, рис. 2б). Согласно критерию Манна–Уитни, ЦРШ показала, что в первые 1–6 ч боль была достоверно меньше у пациентов 2-й группы, чем в 1-й и 3-й группах ($p < 0.001$). В первый час боль была меньше в 3-й группе ($p <$

< 0.01), на 3-й и 6-й час различий между этими группами выявлено не было. Через сутки после операции пациенты 3-й группы оценили болевой синдром как средней силы ($p < 0.001$), по сравнению остальных групп. В 1-й группе болевой синдром был достоверно выше, чем во 2-й группе ($p < 0.05$).

Средние значения болевого синдрома по трем шкалам показали, что интенсивность боли с 1-го по 6-й час после септопластики была достоверно выше в 1-й и 3-й группах ($p < 0.001$). При этом боль была ниже в 3-й группе, по сравнению с 1-й ($p < 0.01$–0.05) (табл. 1, рис. 2д). Через день болевой синдром был ниже в 1-й и 2-й группах, по сравнению с 3-й ($p < 0.001$), а через двое суток во всех группах интенсивность болевого синдрома была низкой, либо ее не было, и статистически неразличимой.

Пик болевого синдрома у пациентов 1-й группы пришелся в день хирургического вмешательства. Максимум интенсивности боли во 2-й группе был выявлен через 6 ч после операции, а у пациентов 3-й группы пик боли пришелся в день операции и через сутки после нее.

Эффективность наркотических анальгетиков и общей анестезии, по сравнению с местной анестезией, исследовалась в работе M.T. Bernardo et al., где показано, что степень боли у их пациентов с тампонадой была равна 4 баллам из 10 [16], что сопоставимо с нашими результатами, а также с данными других исследований [9–11]. Использование опиоидных анальгетиков при проведении септопластики снижает интенсивность болевого синдрома и улучшает качество жизни пациентов [17]. Этим можно объяснить самый низкий показатель боли по всем трем шкалам во 2-й группе. Увеличение интенсивности боли в 3-й группе связано с более ранним сроком удаления тампонов, чем в 1 и 2 группах. Так как преждевременное удаление носового тампона после септопластики может спровоцировать и носовое кровотечение, и острую боль [18], что совпадает с результатами, полученными нами в 3-й группе пациентов и с результатами исследования M.T. Bernardo et al. [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В послеоперационном периоде после септопластики наименьшую болевую реакцию провоцирует схема общей анестезии, примененная во 2 группе: фентанил, пропофол, цисатракурия безилат, транексамовая кислота, атропин и метоклопрамид. Для уменьшения острого болевого синдрома в послеоперационном периоде передние тампоны необходимо удалять через 48 ч после операции.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Orhan I., Aydın S., Ormeci T., Yılmaz F.* A radiological analysis of inferior turbinate in patients with deviated nasal septum by using computed tomography // Am. J. Rhinol. Allergy. 2014. V. 28 P. 68–72.
2. *Andrades P., Cuevas P., Danilla S., Bernales J., Longton C., Borel C., Rodrigo Hernández, Villalobos R.* The accuracy of different methods for diagnosing septal deviation in patients undergoing septorhinoplasty: a prospective study // J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. 2016. V. 69. P. 848–855.
3. *Красножен В.Н., Щербаков Д.А., Володеев А.В., Мусина Л.А., Гарскова Ю.А.* Морфологические и клинические аспекты искривления перегородки носа // Вестник оториноларингологии. 2017. Т 82. № 3. P. 25–27.
4. *Kastyro I.V., Popadyuk V.I., Reshetov I.V., Kostyaeva M.G., Dragunova S.G., Kosyreva T.F., Khamidulin G.V., Shmaevsky P. E.* Changes in the time-domain of heart rate variability and corticosterone after surgical trauma to the nasal septum in rats // Dokl Biochem Biophys. 2021. V. 499. P. 247–250.
5. *Dragunova S.G., Reshetov I.V., Kosyreva T.F., Severin A.E., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Inozemtsev A.N., Popadyuk V.I., Kastyro I.V., Yudin D.K., Yunusov T.Yu., Kleyman V.K., Bagdasaryan V.V., Alieva S.I., Chudov R.V., Kuznetsov N.D., Pinigina I.V., Skopich A.A., M.G. Kostyaeva*. Comparison of the effects of septoplasty and sinus lifting simulation in rats on changes in heart rate variability // Dokl Biochem Biophys. 2021. V. 498. P. 165–169.
6. *Kastyro I.V., Reshetov I.V., Popadyuk V.I., Torshin V.I., Torshin V.I., Ermakova N.V., Ermakova N.V., Karpukhina O.V., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Inozemtsev A.N., Khamidulin G.V., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Shmaevsky P.E., Sardarov G.G, Gordeev D.V., Scopich A.A.* Studying the physiological effects of a new model of septoplasty in rats. // Head and Neck Russian Journal. 2020. V. 8. № 2. P. 33–38.
7. *Kastyro I.V., Popadyuk V.I., Muradov G.M., Reshetov I.V.* Low-intensity laser therapy as a method to reduce stress responses after septoplasty // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2021. V. 500. P. 300–303.
8. *Simsek T., Coskun Musaoglu I., Uluat A.* The effect of lidocaine and tramadol in nasal packs on pain after septoplasty // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. 2019. 276. № 6. P. 1663–1669.
9. *Kastyro, I.V., Romanko, Yu.S., Muradov, G.M., Popadyuk V.I., Kalmykov I.K., Kostyaeva, M.G. Gushchina, Yu.Sh., Dragunova, S.G.* Photobiomodulation of acute pain syndrome after septoplasty // Biomedical Photonics. 2021. V. 10. № 2. P. 34–41.
10. *Kastyro I.V., Torshin V.I., Drozdova G.A., Popadyuk V.I.* Acute pain intensity in men and women after septoplasty // Russian Open Medical Journal. 2017. V. 6. P. e0305.
11. *Popadyuk V.I., Kastyro I.V., Ermakova N.V., Torshin V.I.* Septoplasty and tonsillectomy: acute stress response as

a measure of effectiveness of local anesthetics. // Vestnik otorinolaringologii. 2016. V. 81. № 3. P. 7–11.

12. *Altunkaya H., Ozer Y., Kargi E., Ozkocak I., Mübin Hosnuter, Demirel C.B., Babuccu O.* The postoperative analgesic effect of tramadol when used as subcutaneous local anesthetic. // Anesth. Analg. 2004. V. 99. № 5. P. 1461–1464.

13. *Pang W., Huang P.Y., Chang D.P., Huang M.H.* The peripheral analgesic effect of tramadol in reducing propofol injection pain: a comparison with lidocaine. // Reg. Anesth. PainMed. 1999. V. 24. № 3. P. 246–249.

14. *Sener M., Yilmazer C., Yilmaz I., Ozer C., Donmez A., Arslan G.* Efficacy of lornoxicam for acute postoperative pain relief after septoplasty: a comparison with diclofenac, ketoprofen, and dipyrone. // J. Clin. AnesthPainManag. 2008. V. 20. № 2. P. 103–108.

15. *White P.F.* The changing role of non-opioid analgesic techniques in the management of postoperative pain. // Anesth Analg. 2005. V. 101. № 5S. P. S5–S22.

16. *Bernardo M.T., Alves S., Lima N.B., Helena D., Condé A.* Septoplasty with or without postoperative nasal packing? Prospective study. // Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 2013. V. 79. № 4. P. 471–474.

17. *Rock A.N., Akakpo K., Cheresnick C., Zmistowksi B.M., Essig G.F., Chio E., Nogan S.* Postoperative Prescriptions and Corresponding Opioid Consumption After Septoplasty or Rhinoplasty. // Ear, Nose & Throat Journal. 2020. V. 100. № 5. P. 462S–466S.

18. *Liao Z., Liao W., Tan K.S., Sun Y., Peng A., Zhu Y., He H., Yang S., Xu G., Su R., Yao J., Fan Y., Yang Q., Hong H.* Decreased hospital charges and postoperative pain in septoplasty by application of enhanced recovery after surgery. // Therapeutics and Clinical Risk Management. 2018. V. 14. P. 1871–1877.

EFFECT OF ANESTHESIA ON POSTOPERATIVE PAIN IN PATIENTS AFTER SEPTOPLASTY

I. K. Kalmykov[a,#], G. M. Muradov[a], Academician of the RAS I. V. Reshetov[b], and A. A. Tsymbal[b]

[a] *Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation*

[b] *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: 23kalmykov@gmail.com*

The aim of the study was to assess acute pain syndrome, with different tactics of general anesthesia, in patients after septoplasty. Patients and methods. All patients received local anesthesia with 2% procaine solution. In group 1 (95 people) premedication was used with 2% promedol solution and 60 mg of ketorolac in the evening, in group 2 (72 people) – fentanyl, propofol, cisatracuria besylate, tranexamic acid, atropine and metoclopramide, in group 3 (89 people) – atracuria besylate, sodium thiopental, nitrous oxide and halothane. In groups 2 and 3, 100 mg of ketoprofen was administered intramuscularly in the evening on the day of surgery. Anterior tamponade was carried out with parolon tampons in glove rubber. In groups 1 and 2, the tamponade was removed on day 2, and in group 3 – one day after the operation. Pain syndrome was assessed at 1, 3 and 6 hours, 1 and 2 days after surgery. It was found that the scheme of anesthesia in group 2 is the most preferable, and the nasal tamponade must be removed on the 2nd day after the operation.

Keywords: septoplasty, anesthesia, analog scales, pain

EDN: FRLESN
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 197–202

УДК 576.32/.36 576.893.17

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЯДОВ ЗМЕЙ НА РОСТ ИНФУЗОРИЙ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЯДОВ С ВЫСОКОЙ АНТИПРОТОЗОЙНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2022 г. Е. Г. Черемных[1], А. В. Осипов[2], В. Г. Старков[2], Ч. Т. Т. Нгуен (Nguyen Thi Thuy Trang)[3], Х. К. Нгуен (Nguyen Cuu Khoa)[4], А. Н. Хоанг (Hoang Ngoc Anh)[4], З. Т. Ле (Le Tien Dung)[4], член-корреспондент РАН В. И. Цетлин[2], Ю. Н. Уткин[2,*]

Поступило 20.10.2021 г.
После доработки 25.12.2021 г.
Принято к публикации 25.12.2021 г.

Для поиска соединений с антипротозойной активностью исследовано влияние ядов змей на инфузорий *Tetrahymena pyriformis* из подцарства Protozoa, включающего и возбудителей протозойных инфекций. *T. pyriformis* использована как модельный организм для выбора ядов, наиболее активных против паразитических простейших. К клеткам добавляли различные концентрации ядов и регистрировали число выживших через 24 часа. Из исследованных ядов шести видов змей семейства Viperidae наибольшую активность проявил яд гадюки *Vipera berus,* полностью убивавший клетки при 49 мкг/мл. Из ядов четырех видов змей семейства Elapidae наиболее активными оказались исследованные нами ранее яды кобр, содержащие цитотоксины с высокой антипротозойной активностью, а также яд крайта *Bungarus multicinctus* (10 мкг/мл). Яды щитомордников и гадюки Никольского не проявили активности при концентрациях до 12.5 мг/мл. Таким образом, перспективными для выделения новых антипротозойных соединений являются яды *V. berus* и *B. multicinctus*.

Ключевые слова: антипротозойная активность, гадюка, кобра, крайт, щитомордник, скорпион, яд, *Tetrahymena pyriformis*

DOI: 10.31857/S2686738922020068

Инфекционные заболевания являются актуальной социально-медицинской проблемой практически во всех регионах мира, и не малая доля из них обусловлена протозойными инфекциями, т.е. заболеваниями, вызываемыми простейшими. Протозойными инфекциями (протозоозами) поражены сотни миллионов человек, проживающих преимущественно в странах Азии, Африки и Латинской Америки. Лечение протозойных заболеваний имеет ограниченную эффективность и серьезные побочные эффекты (например, [1]). Помимо этого, эффективному лечению препятствует развитие лекарственной устойчивости у возбудителей заболеваний [2]. Токсичность лекарств, трудности введения и длительность лечения, а также их низкая эффективность стимулируют поиск новых природных антипротозойных соединений, например, среди компонентов животных ядов. Животные яды – это естественные библиотеки биологически активных соединений, которые могут давать новые лекарственные препараты для фармакотерапии. В частности, змеиные яды оказались перспективными источниками потенциальных новых антипротозойных агентов [3].

Так, недавно, используя в качестве модельных организмов инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, мы установили, что яды кобр обладают высокой антипротозойной активностью [4]. Идентификация активных соединений показала, что антипротозойную активность проявляют цитотоксины, относящиеся к семейству трехпетельных белков. Однако цитотоксины обладают сравнительно высокой токсичностью для позвоночных и их использование в качестве антипротозойных препаратов не перспективно. Например, цитотоксины кобры *Naja oxiana* имеют $ЛД_{50}$ в диапазоне 1–2 мг/кг [5]. Целью дан-

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия*
[2]*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*
[3]*Университет им. Нгуен Тат Тхань, Хо Ши Мин, Вьетнам*
[4]*Институт Наук о Прикладных Материалах Вьетнамской Академии Наук и Технологий, Хо Ши Мин, Вьетнам*
**e-mail: utkin@ibch.ru*

ной работы явился поиск соединений, менее токсичных для позвоночных, в ядах различных видов змей.

Яд одного вида змеи может содержать до нескольких сотен различных соединений, обычно называемых токсинами. Однако основная часть токсинов относится примерно к полутора десяткам семейств, наиболее представленными из которых являются фосфолипазы А2, сериновые и металлопротеиназы, а также трехпетельные токсины. Кроме цитотоксинов кобр, антипротозойная активность была продемонстрирована для фосфолипаз А2 [6] и оксидаз L-аминокислот [7]. При этом параметры токсичности фосфолипаз А2 очень сильно различались в зависимости от вида простейшего и вида змеи, из яда которой была выделена фосфолипаза А2. Так, при подавлении внутриэритроцитарного развития *Plasmodium falciparum*, вызывающего малярию, фосфолипазой А2 из яда кобры *N. mossambica* величина IC_{50} составила 0.032 нг/мл. В то же время при подавлении жизнеспособности клеток промастиготной формы *Leishmania infantum*, возбудителя висцерального лейшманиоза, фосфолипазой А2 BmajPLA2-II из яда ботропса *Bothrops marajoensis* IC_{50} не достигалась даже при концентрации 100 мкг/мл [6]. Оксидаза L-аминокислот BjussuLAAO-II из яда жараракусу *B. jararacussu* оказала токсическое действие на *L. amazonensis*, вызывающего кожный лейшманиоз, (IC50 4.56 мкг/мл) и *Trypanosoma cruzi*, вызывающего болезнь Шагаса (IC50 4.85 мкг/мл) [7]. Довольно высокую активность против простейших продемонстрировал кротамин, полипептид, принадлежащий к семейству миотоксинов, из яда гремучей змеи *Crotalus durissus terrificus*. Кротамин оказывал сильное ингибирующее влияние на скорость роста *L. amazonensis* (IC50 = 25.65 ± 0.52 мкг/мл) [9]. Кротамин проявил сильную антиплазмодиальную активность и ингибировал дозозависимым образом развитие паразитов *P. falciparum*, вызывающего малярию (IC50 = 9.13 мкг/мл) [10]. Среди других компонентов ядов змей, проявляющих антипротозойную активность, следует отметить кровирин, цистеин-богатый секреторной белок (CRISP) из *C. viridis viridis* (IC50 = 1–2 мкг/мл в зависимости от вида паразитического простейшего) [10]. Кроме того, дизинтегрин, выделенный из яда *Cerastes cerastes*, проявлял токсичность в отношении промастигот *L. infantum* [11]. При концентрации 0.1 мкг/мл это дизинтегрин вызывал гибель 97.6% промастигот через 72 ч [11].

Следует отметить, трипаносомоз, вызываемый простейшими рода *Trypanosoma*, и лейшманиоз, вызываемый простейшими рода *Leishmania*, представляют серьезную проблему для тропических регионов американского континента [12, 13]. Там же, в частности, в Бразилии, проводятся интенсивные исследования ядов змей и находится крупнейший в мире центр по исследованию ядовитых животных – Институт Бутантан (Instituto Butantan) [14]. Эти факты способствовали тому, что исследования по влиянию ядов змей на простейших выполнены, в основном, с применением ядов южноамериканских видов змей, относящихся к семейству Viperidae. При этом наиболее изучена антипротозойная активность ядов змей двух основных южноамериканских родов – американских копьеголовых змей (*Bothrops/Bothropoides*) и настоящих гремучников (*Crotalus*) [15]. В то же время практически отсутствуют данные об антипротозойной активности ядов змей семейства Viperidae, обитающих в Европе и Азии.

Целью настоящего исследования явились скрининг ядов змей и выявление наиболее перспективных для создания на их основе антипротозойных препаратов. В нашей работе мы поставили задачу исследовать яды евразийских змей: гадюк *Vipera berus*, *V. nikolskii* и *V. ursinii renardi*, а также щитомордников *Gloydius blomhoffii* и *G. saxatilis* и куфии *Trimeresurus albolabris*. Поскольку имелось сообщение об антилейшманиозной активности яда крайта *Bungarus caeruleus* [16], была поставлена задача исследовать также активность ядов двух других видов крайтов *B. fasciatus* и *B. multicinctus*. Яд кобры *N. kaouthia*, для которого ранее было показано наличие антипротозойной активности [4], использован в качестве контроля. Также были исследованы ранее не изученные яды кобры *N. atra* и скорпиона *Heterometrus laoticus*.

Исследование проводили на инфузориях *T. pyriformis* с применением приборно-вычислительного комплекса для автоматизированного биотестирования с системой визуализации и программным обеспечением для математической обработки данных БиоЛат-3.2 (ООО “Европолитест”, Московская обл., г. Пушкино). Использованная нами методика включает процедуру подсчета клеток тест-организмов инфузорий *T. pyriformis*, которая позволяет получить достоверный результат за короткое время (≤24 ч). Для сравнения токсической активности исследуемых ядов змей нами использован способ кратных разведений проб исследуемых объектов. Этот прием общепринят в практике оценки токсичности с помощью биологических методов. То есть методика оценки степени антипротозойной активности ядов змей для выбора наиболее эффективных препаратов, как наиболее токсичных для простейших, основана и на процедуре подсчета клеток в пробе, и на приеме кратных разведений.

Все эксперименты проводили на четырехсуточных инфузориях, которые культивировали по закрытой системе в стерильных условиях. Суспензию инфузорий из культивационной пробирки разводили в десять раз дистиллированной во-

Таблица 1. Коэффициенты выживаемости[1] инфузорий *T. pyriformis* в растворах ядов при экспозиции 24 ч

Концентрация яда, мкг/мл	Вид животного[2]										
	NA	NK	BM	BF	VB	VU	TA	VN	GB	GS	HL
	Коэффициент выживаемости (K)										
12500	–[3]	–	–	**0**	**0**	0	0	3.22 ± 0.16[4]	4.93 ± 0.18	3.1 ± 0.16	4.56 ± 0.21
6250	–	–	–	**0**	**0**	0	0	2.84 ± 0.23	4.71 ± 0.19	2.47 ± 0.22	4.47 ± 0.12
3120	–	–	–	**0**	**0**	0	0	2.19 ± 0.19	4.42 ± 0.12	2.26 ± 0.12	3.66 ± 0.2
1560	–	–	–	**0**	**0**	0	0	1.79 ± 0.18	2.93 ± 0.15	1.48 ± 0.11	3.43 ± 0.15
1000	**0**	**0**	**0**	–	–	–	–	–	–	–	–
780	–	–	–	**0**	**0**	1.19 ± 0.1	0.99 ± 0.11	1.51 ± 0.14	2.55 ± 0.17	1.61 ± 0.12	2.5 ± 0.15
390	–	–	–	**0**	**0**	1.79 ± 0.2	0.94 ± 0.14	2 ± 0.16	1.72 ± 0.14	1.34 ± 0.15	2.54 ± 0.13
195	–	–	–	**0**	**0**	2.92 ± 0.18	1.06 ± 0.15	2.13 ± 0,2	1.48 ± 0.08	0.96 ± 0.13	2.33 ± 0.15
100	**0**	**0**	**0**	–	–	–	–	–	–	–	–
98	–	–	–	2.08 ± 0.13	**0**	2.94 ± 0.14	1.37 ± 0.15	2.17 ± 0.13	1.55 ± 0.16	1.75 ± 0.16	2.38 ± 0.14
49	–	–	–	1.96 ± 0.21	**0**	1.64 ± 0.13	–	–	–	–	–
24	–	–	–	2.34 ± 0.15	1.53 ± 0.05	2.47 ± 0.16	–	–	–	–	–
12	–	–	–	3 ± 0.1	2.29 ± 0.2	2.39 ± 0.1	–	–	–	–	–
10	**0**	**0**	**0**	–	–	–	–	–	–	–	–
6	–	–	–	3.91 ± 0.25	2.49 ± 0.1	3.97 ± 0.23	–	–	–	–	–
3	–	–	–	3.48 ± 0.14	2.54 ± 0.17	2.2 ± 0.12	–	–	–	–	–
1.5	–	–	–	3.58 ± 0.09	2.06 ± 0.12	1.66 ± 0.18	–	–	–	–	–
1	**0**	**0**	1.99 ± 0.22	–	–	–	–	–	–	–	–
0.8	–	–	–	3.4 ± 0.1	2.33 ± 0.07	1.85 ± 0.08	–	–	–	–	–
0.1	2.0 ± 0.15[4]	2.42 ± 0.09	1.9 ± 0.15	–	–	–	–	–	–	–	–
0.01	1.93 ± 0.07	2.7 ± 0.15	3.04 ± 0.14	–	–	–	–	–	–	–	–

[1] Коэффициент выживаемости – отношение числа живых инфузорий в растворах ядов к числу живых инфузорий в контроле.
[2] NA – кобра *N. atra*, NK – кобра *N. kaouthia*, BM – крайт *B. multicinctus*, BF – крайт *B. fasciatus*, VB – гадюка *V. berus*, VU – гадюка *V. ursinii renardi*, VN – гадюка *V. nikolskii*, TA – куфия *T. albolabris*, GB – щитомордник *G. blomhoffii*, GS – щитомордник *G. saxatilis*, HL – скорпион *H. laoticus*.
[3] Дефис означает, что при данной концентрации анализ не проводился.
[4] Среднее по трем измерениям ± стандартное отклонение.

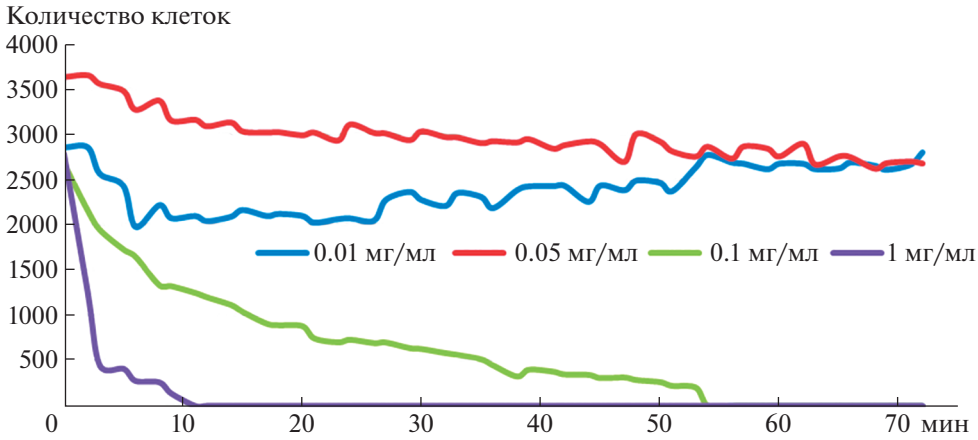


Рис. 1. Изменение количества живых клеток *T. pyriformis* в зависимости от времени действия различных концентраций яда гадюки *V. berus*.

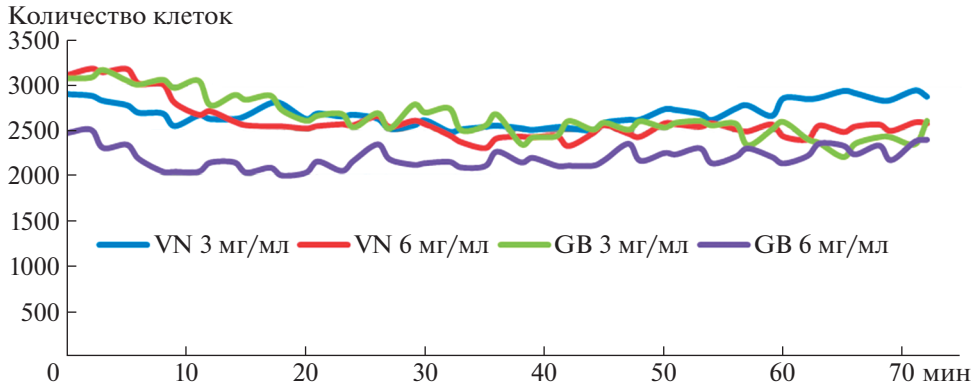


Рис. 2. Изменение количества живых клеток *T. pyriformis* в зависимости от времени действия различных концентраций ядов гадюки *V. nikolskii* (VN) и щитомордника *G. blomhoffii* (GB).

дой. Для контроля в опытах также использовали дистиллированную воду. В лунки планшета прибора БиоЛат-3.2 вносили 290 мкл проб, представляющих собой водные растворы ядов змей в различных концентрациях (табл. 1), включали программу AutoCiliata и помещали планшет с пробами в прибор. После оценки программой лунок с пробами без инфузорий вносили в каждую лунку суспензию инфузорий, содержащую 500–1000 клеток. Каждое разведение повторяли в 3 лунках. Далее производили десятикратный программный подсчет клеток и фиксировали результаты. Планшет помещали в термостат и через 24 ч повторно с использованием программы подсчитывали инфузорий во всех заданных лунках. Для количественной оценки рассчитывали коэффициенты выживаемости/роста (K)

$$K = A_{24}/A_0,$$

где A_{24} – количество живых инфузорий в пробе после 24-часовой экспозиции; A_0 – количество живых инфузорий в начале опыта. Коэффициенты роста/выживаемости по каждому разведению вычисляли как среднее по трем коэффициентам для лунок с одинаковыми пробами. В наших контрольных опытах, состоящих в 24-часовой экспозиции инфузорий в дистиллированной воде, этот коэффициент определяется соотношением: $2.5 \geqslant K \geqslant 2$. Кроме того, для определения чувствительности простейших нами использовался раствор $CuSO_4$ (0.1 мкМ), который вызывал гибель всех клеток в течение одного часа. Для определения зависимости гибели клеток от времени инкубации проводили регистрацию выживших инфузорий в течение часа. В краткосрочном эксперименте использовали от 2000 до 4000 клеток.

Результаты исследования ядов четырех видов змей семейства Elapidae (кобры и крайты), шести видов змей семейства Viperidae и одного вида скорпиона приведены в табл. 1. Как видно из таблицы, коэффициенты выживаемости сильно зависели от концентрации яда и вида ядовитого животного. Коэффициенты, равные нулю, свидетельствуют о полной гибели инфузорий. Наиболее токсичными для *T. pyriformis* оказались яды кобр *N. atra* и *N. kaouthia*.

Их яд убивал инфузории при концентрации 1 мкг/мл. Ранее мы показали, что в ядах кобр активными компонентами, вызывающими гибель инфузорий, являются цитотоксины [4].

Существенную токсичность по отношению к *T. pyriformis* проявил также яд крайта *B. multicinctus*, приводивший к гибели всех клеток при концентрации 10 мкг/мл. Менее активным оказался яд другого крайта *B. fasciatus*, показавший активность в концентрации около 200 мкг/мл. При разведениях яда крайта *B. fasciatus* до 12 мкг/мл и менее наблюдали увеличение коэффициента роста клеток *T. pyriformis* по сравнению с контролем. Этот же эффект для крайта *B. multicinctus* выявлен при концентрации яда 10 нг/мл. По-видимому, разная активность этих ядов по отношению к простейшим объясняется отличиями в их составе. Так, с использованием количественной протеомики было показано, что в яде *B. multicinctus* почти половина (45%) белков по массе представлена β-бунгаротоксинами, за ними следуют трехпетельные токсины (28%) и фосфолипазы А2 (16%), при этом другие белки присутствуют на уровне 1–3% [17]. В противоположность ему, яд *B. fasciatus* содержит крайне низкое количество трехпетельных токсинов (1%) и β-бунгаротоксинов (менее 1%), а основным компонентом являются фосфолипазы А2 (71%); за ними следуют оксидаза L-аминокислот (8%), ацетилхолинэстераза (5%) и металлопротеиназы (4%) [17]. Обнаруженный эффект усиленного роста клеток *T. pyriformis* по сравнению с контролем при разведении яда указывает на изменение направления воздействия, т.е. некоторые компоненты ядов, вероятно, могут усиливать рост клеток при уменьшении концентрации ингибирующих компонентов.

Из исследованных ядов змей семейства Viperidae наибольшую активность проявил яд обыкновенной гадюки *V. berus*, вызвавший гибель клеток при концентрации около 50 мкг/мл. Менее активными оказались яды степной гадюки *V. ursinii renardi* и белогубой куфии *T. albolabris*. Эти яды полностью убивают клетки при концентрации 1.56 мг/мл. Яды щитомордников *G. blomhoffii* и *G. saxatilis*, гадюки Никольского, а также скорпиона *Heterometrus laoticus* не проявили антипротозойной активности в концентрациях до 12.5 мг/мл. Наоборот, в высоких концентрациях они благоприятствуют росту инфузорий и, по-видимому, содержат соединения, ускоряющие рост микроорганизмов или являются для них питательной средой.

В краткосрочном опыте яд *V. berus* также показал высокую токсичность для простейших. При концентрации 1 мг/мл гибель всех клеток происходила в течение 10 мин (рис. 1). В то же время яды *V. nikolskii* и *G. blomhoffii* не проявили никакого эффекта при концентрации 6 мг/мл (рис. 2).

Все изученные нами яды в том или ином количестве содержат фосфолипазы А2 и оксидазы L-аминокислот, яды змей семейства Viperidae – дизинтегрины, но ни один из ядов не содержит кротамин. Следует отметить, что яд *B. multicinctus* не содержит цитотоксины [17], но лишь на порядок менее активен, чем яды кобр (табл. 1). С другой стороны, он примерно на порядок более активен, чем яд *B. fasciatus*, содержание фосфолипаз А2 и оксидазы L-аминокислот в котором существенно выше [17]. Яд *V. berus*, проявивший самую высокую активность среди ядов змей семейства Viperidae, содержит меньше фосфолипаз А2, чем яды *V. ursinii renardi* и *V. nikolskii* [18, 19], а содержание оксидазы L-аминокислот в яде *V. berus* немного выше, чем в ядах других гадюк: приблизительно в два раза выше, чем в яде *V. ursini renardi* [18, 19], что не может объяснить 30-кратную разницу в их антипротозойной активности.

Таким образом, нельзя исключить, что яды *V. berus* и *B. multicinctus* содержат некоторые специфические соединения с антипротозойным эффектом. Какие конкретно компоненты этих ядов отвечают за антипротозойную активность, будет выявлено в последующих исследованиях.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 21-54-54005 и Вьетнамской академии наук и технологий (проект QTRU01.15/21-22).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sperandio da Silva G.M., Mediano M.F., Alvarenga Americano do Brasil P.E., et al.* A clinical adverse drug reaction prediction model for patients with chagas disease treated with benznidazole. // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. V. 58. № 11. P. 6371–6377.
2. *Meyer A., Holt H.R., Selby R., Guitian J.* Past and ongoing tsetse and animal trypanosomiasis control operations in five African countries: a systematic review. // PLoS Negl Trop Dis. 2016. V. 10. № 12. P. e0005247.
3. *Adade C.M., Souto-Padrón T.* Venoms as Sources of Novel Anti-Parasitic Agents. In: Toxins and Drug Discovery. Gopalakrishnakone P., Cruz L., Luo S. (eds) 2017. P. 401–436. Springer, Dordrecht.
4. *Kuleshina O.N., Kruykova E.V., Cheremnykh E.G., et al.* Screening snake venoms for toxicity to Tetrahymena pyriformis revealed anti-protozoan activity of cobra cytotoxins. // Toxins (Basel). 2020. V. 12. № 5. P. 325.
5. *Гришин Е.В., Сухих А.П., Адамович Т.Б., Овчинников Ю.А.* Выделение, свойства и аминокислотная последовательность двух цитотоксинов из яда

среднеазиатской кобры Naja naja oxiana. // Биоорг. химия 1976. Т. 2. № 8. С. 1018–1034.

6. *Teixeira S.C., da Silva M.S., Gomes A.A.S., et al.* Panacea within a Pandora's box: the antiparasitic effects of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. // Trends Parasitol. 2021. P. S1471–4922(21)00169-0.
7. *Carone S.E.I., Costa T.R., Burin S.M., et al.* A new l-amino acid oxidase from Bothrops jararacussu snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of proapoptotic and antiprotozoal activities. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 103. P. 25–35.
8. *Katz S., Barbiéri C.L., Soler F.P.M., et al.* Effect of Isolated Proteins from Crotalus Durissus Terrificus Venom on Leishmania (Leishmania) Amazonensis-Infected Macrophages. // Protein Pept. Lett. 2020. V. 27. № 8. P. 718–724.
9. *El Chamy Maluf S., Dal Mas C., Oliveira E.B., et al.* Inhibition of malaria parasite Plasmodium falciparum development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. // Peptides. 2016. V. 78. P. 11–16.
10. *Adade C.M., Carvalho A.L., Tomaz M.A., et al.* Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against Trypanosomes and Leishmania. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2014. V. 8. № 10. P. e3252.
11. *Allane D., Oussedik-Oumehdi H., Harrat Z., et al.* Isolation and characterization of an anti-leishmanial disintegrin from Cerastes cerastes venom. // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2018. V. 32. № 2.
12. *Miles M.A., Llewellyn M.S., Lewis M.D., et al.* The molecular epidemiology and phylogeography of Trypanosoma cruzi and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. // Parasitology. 2009. V. 136. № 12. P. 1509–1528.
13. *Romero G.A., Boelaert M.* Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2010. V. 4. № 1. P. e584.
14. *Grego K.F., Vieira S.E.M., Vidueiros J.P., et al.* Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. // J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 2021. V. 27. P. e20200068.
15. *Abdullahi Z.U., Musa S.S., He D., et al.* Antiprotozoal Effect of Snake Venoms and Their Fractions: A Systematic Review. // Pathogens. 2021. V. 10. № 12. P. 1632.
16. *Bhattacharya S., Ghosh P., De T., Gomes A., et al.* In vivo and in vitro antileishmanial activity of Bungarus caeruleus snake venom through alteration of immunomodulatory activity. // Exp. Parasitol. 2013. V. 135. № 1. P. 126–33.
17. *Ziganshin R.H., Kovalchuk S.I., Arapidi G.P., et al.* Quantitative proteomic analysis of Vietnamese krait venoms: Neurotoxins are the major components in Bungarus multicinctus and phospholipases A2 in Bungarus fasciatus. // Toxicon. 2015. V. 107. Pt. B. P. 197–209.
18. *Kovalchuk S.I., Ziganshin R.H., Starkov V.G., et al.* Quantitative proteomic analysis of venoms from Russian vipers of Pelias group: phospholipases A_2 are the main venom components. // Toxins (Basel). 2016. V. 8. № 4. P. 105.
19. *Al-Shekhadat R.I., Lopushanskaya K.S., Segura Á., et al.* Vipera berus berus venom from Russia: venomics, bioactivities and preclinical assessment of Microgen antivenom. // Toxins (Basel). 2019. V. 11. № 2. P. 90.

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECT OF SNAKE VENOMS ON THE GROWTH OF CILIATES TETRAHYMENA PYRIFORMIS: IDENTIFICATION OF VENOMS WITH HIGH ANTIPROTOZOAL ACTIVITY

E. G. Cheremnykh[a], A. V. Osipov[b], V. G. Starkov[b], Nguyen Thi Thuy Trang[c], Nguyen Cuu Khoa[d], Hoang Ngoc Anh[d], Le Tien Dung[d], Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin[b], and Yu. N. Utkin[b,#]

[a] *Mental Health Research Centre, Moscow, Russian Federation*

[b] *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[c] *Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[d] *Institute of Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[#] *e-mail: utkin@ibch.ru*

To search for compounds with antiprotozoal activity, effects of snake venoms on the ciliates *Tetrahymena pyriformis* was studied. *T. pyriformis* from subkingdom of Protozoa, including the protozoal pathogens, was used as a model organism to select the venoms most active against parasitic protozoa. Various concentrations of venoms were added to the cells and the cells survived at 24 hours were counted. Among the six snake species from the Viperidae family, the most active was the venom of the viper *Vipera berus*, which completely killed the cells at 49 μg/ml. Among four species from the Elapidae family, the most active were the earlier studied by us cobra venoms containing cytotoxins with strong antiprotozoal activity as well as the venom of krait *Bungarus multicinctus* (10 μg/ml). The venoms of the pitvipers and Nikolsky's viper did not show any activity at 12.5 mg/ml. Thus, the venoms of *V. berus* and *B. multicinctus* are promising for the isolation of new antiprotozoal compounds.

Keywords: antiprotozoal activity, viper, cobra, krait, pitviper, scorpion, venom, *Tetrahymena pyriformis*

EDN: BPUTKE
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 203–207

УДК 577.171.52+577.17.05+57.022

ПРЕНАТАЛЬНЫЙ СТРЕСС И АДАПТИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПОТОМКОВ: РОЛЬ ПЛАЦЕНТАРНОГО СЕРОТОНИНА

© 2022 г. Н. С. Бондаренко[1], С. Н. Воронова[1], Е. Е. Воронежская[1], В. И. Мельникова[1,*]

Представлено академиком РАН В.А. Ткачуком
Поступило 11.12.2021 г.
После доработки 12.01.2022 г.
Принято к публикации 12.01.2022 г.

Исследовали влияние умеренного пренатального стресса у мышей, приводящего к повышению уровня серотонина в плаценте, на формирование адаптивного поведения у потомства мужского пола в возрасте 35 дней. Показали, что у мышей линии BalbC ежедневная иммобилизация в течение 1 ч в период с 11 по 14 дни беременности приводила к повышению уровня серотонина в плаценте и тканях плода на 15 день внутриутробного развития. Согласно результатам поведенческого теста “резидент-интрудер”, потомки самок, подвергавшихся стрессу во время беременности, демонстрировали более реактивное поведение во взрослом состоянии и были менее склонны защищать свою территорию. Таким образом, серотонин, образующийся в плаценте под действием стресса, может выступать посредником между окружающей средой и организмом и обусловливать формирование будущего адаптивного поведения потомства.

Ключевые слова: серотонин, пренатальное развитие, плацента, копинг-стратегии, адаптивное поведение, мыши

DOI: 10.31857/S2686738922020056

В пренатальном периоде развития у млекопитающих факторы внешней среды способны влиять на реализацию генетической программы развития плода с помощью различных путей и сигнальных молекул. Одним из таких активно изучаемых сигнальных соединений является серотонин – ключевой регулятор пролиферации, апоптоза, дифференцировки и миграции клеток в развивающемся организме [1, 2]. Установлена важная роль серотонина в контроле формирования нервной системы плода [3]. Модуляция уровня серотонина в мозге животных в критические периоды пренатального развития приводит к изменениям в процессе формирования межнейронных связей [4].

Известно, что у мышей плацента играет ведущую роль в поддержании необходимого уровня серотонина у плода в период с 11 по 16 дни эмбрионального развития (Э11–Э16), когда происходит активный нейрогенез и рост аксонов в мозге [5]. Синтез серотонина в плаценте чувствителен к влиянию внешних факторов. Например, умеренный стресс или воспаление у беременной самки повышает уровень серотонина в плаценте и влияет на формирование иннервации переднего мозга плода [6]. Причем вызванные изменения сохраняются на протяжении постнатальной жизни [7, 8], и могут лежать в основе дальнейших изменений в поведении животных во взрослом состоянии.

В данной работе мы исследовали влияние факторов внешней среды на формирование адаптивного поведения у потомства и роль плацентарного серотонина в этом процессе. Была использована описанная ранее модель умеренного пренатального стресса, приводящая к повышению синтеза серотонина в плаценте мышей [9]. Мы оценивали формирование стратегий преодоления трудностей (копинг-стратегий) как аспекта адаптивного поведения у потомства мужского пола на 35 день постнатального развития (П35).

[1]*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
**e-mail: v.melnikova@idbras.ru*

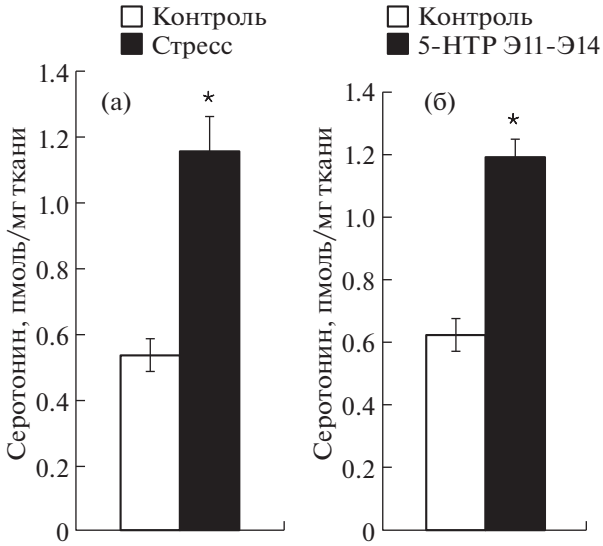


Рис. 1. Концентрация серотонина в плаценте мышей после умеренного стресса (а) или перорального введения предшественника серотонина (5-HTP) (б). Беременных самок подвергали иммобилизационному стрессу в течение 1 ч ежедневно с Э11 по Э14; концентрацию серотонина в плаценте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на Э15. Контролем служили интактные беременные самки. $n = 10$ плацент от 3 беременных самок в каждой группе. Результаты представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем (тест Манна–Уитни).

Работа проведена на мышах линии BalbC. Беременных самок подвергали стрессу (иммобилизация) ежедневно в период Э11–Э14. В дополнительной серии экспериментов беременные самки в тот же период ежедневно получали перорально предшественник серотонина 5-гидрокситриптофан (5-HTP) в дозе 1 мг/кг. Контролем служили интактные беременные самки. Серотонин в плаценте и тканях плода определяли на Э15 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [10]. Для оценки формирования адаптивного поведения потомства использовали стандартный тест “резидент-интрудер” [11] на П35. Все манипуляции с мышами одобрены Локальным этическим комитетом ИБР РАН (протокол № 22 от 15 марта 2018 г.).

Для моделирования пренатального стресса была использована ранее описанная схема, в которой умеренный стресс (ежедневно в течение 2 ч в период Э10–Э16) вызывал повышение уровня серотонина в плаценте у мышей линии C57BL/6 [9]. Однако на мышах линии BalbC такое воздействие снижало уровень серотонина в плаценте (0.538 ± 0.050 и 0.302 ± 0.050 пмоль/мг ткани в контроле и при стрессе соответственно). Мы предположили, что это может быть обусловлено разной чувствительностью к стрессу мышей этих линий, и скорректировали условия эксперимента, уменьшив продолжительность стресса до 1 ч в день в период Э11–Э14. В результате это привело к двукратному увеличению серотонина в плаценте на Э15 (рис. 1а).

В группе мышей, получавших предшественник серотонина в физиологических концентрациях, выявлено повышение уровня серотонина в плаценте на Э15, сравнимое с таковым после воздействия стресса (рис. 1б).

Согласно данным литературы, у мышей плацента играет ведущую роль в поддержании необходимого уровня серотонина у плода в период Э11–Э16, а затем возрастает синтез серотонина в собственных тканях плода, и роль плаценты ослабевает [5]. В данной работе животных подвергали стрессу именно в период ведущей роли плаценты как источника серотонина. Повышение его уровня в плаценте после стресса может являться причиной дальнейших изменений в развитии мозга плодов, а затем и в поведении животных уже во взрослом состоянии [8]. Известно, что серотонин матери практически не проходит через плаценту к плоду [5].

Мы показали, что влияние стресса на синтез серотонина в плаценте зависит от интенсивности воздействия. Повышение в результате воздействия умеренного стресса сопоставимо с эффектом от перорального введения предшественника серотонина 5-HTP. Существуют данные о том, что при воспалении, которое также является стрессом, могут повышаться доступность 5-HTP в плаценте и активность триптофангидроксилазы [6]. Хотя точный механизм этого повышения остается неизвестным, можно предположить, что стресс в наших экспериментах также повышал доступность предшественника для синтеза

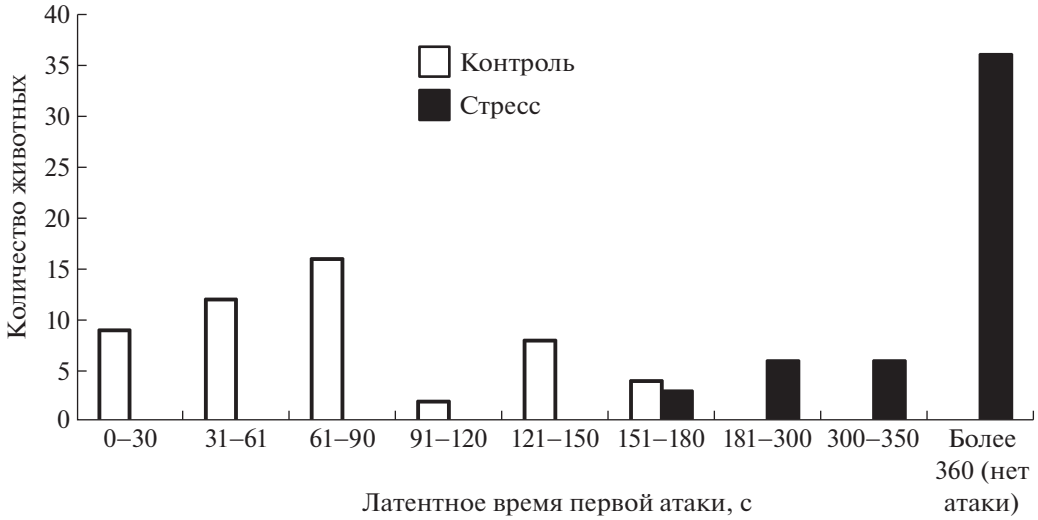


Рис. 2. Влияние пренатального стресса на копинг-стратегии у потомства. Тест "резидент-интрудер" проведен на 35-дневных самцах мышей (n = 50), подвергавшихся пренатальному стрессу в период Э11-Э14. Контролем служили потомки интактных беременных мышей (n = 50). Наблюдение за животными проводили в течение 6 мин.

серотонина в той же мере, что и кормление самок 5-HTP. Вопрос о том, с чем связано снижение уровня серотонина в плаценте при увеличении интенсивности стресса, требует дальнейших исследований.

Мы также обнаружили, что умеренный стресс достоверно повышал уровень серотонина не только в плаценте, но и в тканях плода с 0.012 ± ± 0.002 пмоль/мг до 0.022 ± 0.002 пмоль/мг ткани (p < 0.05). Согласно данным литературы, как слишком низкий, так и слишком высокий уровень серотонина в мозге плода может иметь значение при формировании межнейронных связей [8]. Рецепторы к серотонину у грызунов появляются в онтогенезе довольно рано, еще до формирования этих связей, и серотонин может оказывать морфогенетическое действие на эти процессы [12]. У мышей рост аксонов активно происходит в период Э11–Э16 [5], когда плацента функционирует как ведущий источник серотонина. Таким образом, изменения уровня серотонина в мозге животных в критические периоды внутриутробного развития могут приводить к изменениям в процессе формирования межнейронных связей, а следовательно, и поведения, в частности, в способности этих животных реагировать на меняющиеся условия окружающей среды, что может быть важно для выживания популяции в целом.

Для анализа возможного влияния умеренного пренатального стресса на адаптивное поведение взрослых потомков мы исследовали формирование у них стратегий преодоления трудностей с помощью теста "резидент-интрудер". Согласно полученным данным, большинство мышей контрольной группы атаковали интрудера в течение первых 2 мин (рис. 2).

В целом все мыши этой группы демонстрировали атаку на интрудера в течение 3 мин. Мыши из опытной группы начинали атаковать интрудера не ранее, чем через 2 мин после его появления в клетке. У большинства мышей этой группы не наблюдалось атакующего поведения в течение всего периода наблюдения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение уровня серотонина в плаценте в пренатальном периоде после воздействия стресса сопровождалось изменением в поведении потомства мужского пола. Исследование проводили на самцах в соответствии с данными литературы о том, что у самок, чьи матери подвергались стрессу в период беременности, последующие изменения в поведении отличались от самцов, и затрагивали такие аспекты, как тревожность и депрессию [13]. У самцов изменения касались в основном аспектов социального поведения [4]. Используемый нами поведенческий тест как раз характеризует изменения аспектов поведения, характерных именно для самцов. Известно также, что потомство мужского пола более чувствительно к пренатальному стрессу, чем женского [14].

Стратегии преодоления трудностей, или копинг-стратегии, представляют собой поведенческие и физиологические адаптации к различным условиям окружающей среды и базируются на особенностях функционирования нервной и нейроэндокринной систем. Выделяют два типа поведения, определяющих копинг-стратегии – проактивный и реактивный. Проактивный тип отличается высокой агрессивностью, высокой скоростью

принятия решений, реактивный тип – низкой агрессивностью, большей гибкостью, легче адаптируется к меняющимся внешним условиям [15].

Мы видим, что животные из опытной группы отличались от контроля гораздо большей социальной гибкостью и лабильностью и низкой агрессивностью, тогда как для контрольных мышей было характерно стремление защитить свою территорию. То есть поведение потомков после пренатального стресса стало более реактивным. В свою очередь, умеренный стресс может возникать у беременных самок при изменении условий окружающей среды. Соотношение в популяции количества животных с разными типами поведения, особенно у видов с выраженным социальным взаимодействием, в целом определяет способность популяции к выживанию как в стабильных, так и меняющихся внешних условиях. Увеличение внутри группы доли животных, демонстрирующих реактивное поведение, может давать этой группе преимущество в нестабильных условиях окружающей среды, что важно для выживания популяции в этой ситуации.

Таким образом, плацентарный серотонин может опосредовать влияние внешней среды на развитие плода, и вызывать у потомства долгосрочные изменения паттернов поведения, которые лежат в основе их адаптивных возможностей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают об отсутствии конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проводилось в рамках госзадания № 0088-2021-0020.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда 17-14-01353.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gaspar P., Cases O., Maroteaux L.* The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics // Nature Reviews Neuroscience. 2003. V. 4. № 12. P. 1002–1012.

2. *Hanswijk S.I., Spoelder M., Shan L., et al.* Gestational factors throughout fetal neurodevelopment: the serotonin link // International journal of molecular sciences. 2020. V. 21. № 16. P. 5850.

3. *Whitaker-Azmitia P.M., Druse M., Walker P., et al.* Serotonin as a developmental signal // Behavioural brain research. 1995. V. 73. № 1–2. P. 19–29.

4. *Gur T.L., Palkar A.V., Rajasekera T.A., et al.* Prenatal stress disrupts social behavior, cortical neurobiology and commensal microbes in adult male offspring // Behavioural brain research. 2019. V. 359. P. 886–894.

5. *Bonnin A., Goeden N., Chen K., et al.* A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain // Nature. 2011. V. 472. № 7343. P. 347–350.

6. *Goeden N., Velasquez J., Arnold K.A., et al.* Maternal inflammation disrupts fetal neurodevelopment via increased placental output of serotonin to the fetal brain // Journal of Neuroscience. 2016. V. 36. № 22. P. 6041–6049.

7. *Miyagawa K., Tsuji M., Fujimori K., et al.* Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice // Neuroscience research. 2011. V. 70. № 1. P. 111–117.

8. *Velasquez J.C., Zhao Q., Chan Y., et al.* In utero exposure to citalopram mitigates maternal stress effects on fetal brain development // ACS chemical neuroscience. 2019. V. 10. № 7. P. 3307–3317.

9. *Chen H.J., Antonson A.M., Rajasekera T.A., et al.* Prenatal stress causes intrauterine inflammation and serotonergic dysfunction, and long-term behavioral deficits through microbe-and CCL2-dependent mechanisms // Translational psychiatry. 2020. V. 10. № 1. P. 1–12.

10. *Ivashkin E., Khabarova M.Y., Melnikova V., et al.* Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Reports. 2015. V. 12. P. 1144–1158.

11. *Koolhaas J.M., Coppens C.M., de Boer S.F., et al.* The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress // JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2013. № 77. P. e4367.

12. *Buznikov G.A., Lambert W.H., Lauder J.M.* Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell and tissue research. 2001. V. 305. № 2. P. 177–186.

13. *Gur T.L., Shay L., Palkar A.V., et al.* Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult female offspring // Brain, behavior, and immunity. 2017. V. 64. P. 50–58.

14. *Hodes G.E., Epperson C.N.* Sex differences in vulnerability and resilience to stress across the life span // Biological psychiatry. 2019. V. 86. № 6. P. 421–432.

15. *Koolhaas J.M., Korte S.M., de Boer S.F., et al.* Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 1999. V. 23. № 7. P. 925–935.

PRENATAL STRESS AND ADAPTIVE BEHAVIOR OF OFFSPRING: THE ROLE OF PLACENTAL SEROTONIN

N. S. Bondarenko[a], S. N. Voronova[a], E. E. Voronezhskaya[a], and V. I. Melnikova[a,#]

[a] *Koltsov Institute of Developmental biology RAS, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: v.melnikova@idbras.ru*

Presented by Academician of the RAS V.A. Tkachyuk

The effect of mild prenatal stress in mice, leading to an increase in the placental serotonin level, on the formation of adaptive behavior in male offspring at the age of 35 days was studied. It was shown that in BalbC mice daily immobilization for 1 hour during the period from 11 to 14 days of pregnancy led to an increase in placental and fetal serotonin levels on the 15th day of prenatal development. According to "resident-intruder" behavioral test, the prenatally stressed mice showed more reactive behavior in adulthood and low tendency to defend their territory. Thus, placental serotonin, formed under the stress condition, may act as a mediator between the environment and the fetuses and determine the adaptive behavior of offspring.

Keywords: serotonin, prenatal development, placenta, coping-styles, adaptive behavior, mice

EDN: KYSPSN
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 208–212

УДК 577.218

РОЖДЕНИЕ НОВОЙ ИЗОФОРМЫ POU2F1 У ПРИМАТОВ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

© 2022 г. Б. М. Льянова[1], А. П. Котнова[1,*], А. А. Макарова[1], академик РАН Ю. В. Ильин[1], член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева[1], А. Г. Степченко[1], Е. В. Панкратова[1]

Поступило 14.12.2021 г.
После доработки 17.01.2022 г.
Принято к публикации 17.01.2022 г.

Появление новых генов и функций имеет первостепенное значение в возникновении новых видов животных. Так, инсерция мобильного элемента Tigger 2 в последовательность функционального гена *POU2F1* у приматов привела к образованию новой химерной примат-специфичной изоформы POU2F1Z, трансляция которой активируется при клеточном стрессе. Ее мРНК обнаружена для всех видов обезьян, начиная с макак. Анализ фрагментов копии Tigger2, соответствующих человеческому экзону Z, показал, что сайты сплайсинга экзона Z гомологичны у человека и у большинства обезьян, за исключением лемуров и галаго. Стоп-кодон, привнесенный в мРНК последовательностью Tigger2, присутствует у всех приматов, начиная с макак. Внутренний ATG-кодон также есть у всех приматов, за исключением лемуров и галаго. В процессе эволюции в копию Tigger2 встраивались другие МГЭ, преимущественно типа SINE. В ходе эволюции изменялось как место расположения, так и численность мобильных элементов SINE в пределах гена *POU2F1.* Начиная с макак, паттерн расположения SINE-элементов внутри копии Tigger2 в исследуемом участке гена *POU2F1* закрепился и далее сохранялся в неизменном виде у остальных приматов и человека, что может свидетельствовать о его функциональной значимости.

Ключевые слова: ген *POU2F1*, мобильные генетические элементы, карцинома головы
DOI: 10.31857/S2686738922020147

POU2F1 оверэкспрессируется во многих злокачественных опухолях и опухолевых клеточных линиях. При этом высокий уровень белка POU2F1 коррелирует с крайне неблагоприятным прогнозом течения заболевания [1–7]. Так, в работе Sharpe и соавт. [3] показан повышенный уровень экспрессии POU2F1 в клеточных линиях карциномы головы и шеи по сравнению с образцами нераковых клеток тех же тканей у тех же пациентов. Нокдаун *POU2F1* приводил к существенному снижению пролиферации и роста в клеточных линиях этих типов опухолей. Показано, что POU2F1 регулирует регенерацию и опухолевую трансформацию в клеточной линии HCT116 (клетки опухоли прямой кишки) [5] и других опухолей [4, 6–9].

Интересно, что уровень обнаруженного белка POU2F, зачастую не коррелирует с уровнем соответствующей мРНК. Так, например, в костном мозге обнаружено высокое содержание мРНК *POU2F1*, но соответствующего белка в этой ткани незначительное количество. В прямой кишке, наоборот, количество соответствующей мРНК сравнительно небольшое, а количество белка – одно из самых высоких. Это возможно, если экспрессия POU2F1 регулируется в значительной степени на уровне трансляции.

Нами была обнаружена новая изоформа *POU2F1Z*, трансляция которой многократно возрастает при клеточном стрессе. Одной из функций этой изоформы является защита клеток от повреждающего действия различных видов стресса [10]. мРНК *POU2F1Z* экспрессируется во всех тканях и клетках человека, но на максимальном уровне она обнаруживается в коре головного мозга и в лимфоидных клетках. В частности, высокий уровень экспрессии белка POU2F1Z был обнаружен нами в опухолевых клетках лимфомы Беркитта Namalwa. Интересно, что у человека обнаружены сразу две мРНК (MT294127 и AK091438.1), с которых транслируется один и тот же белок POU2F1Z (UniProt KBP14859-3). Эти мРНК транскрибируются с двух альтернативных промоторов гена *POU2F1* и отличаются 5-концевыми последовательностями. По сравнению с хорошо

[1]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия*
**e-mail: alina_kotnova@mail.ru*

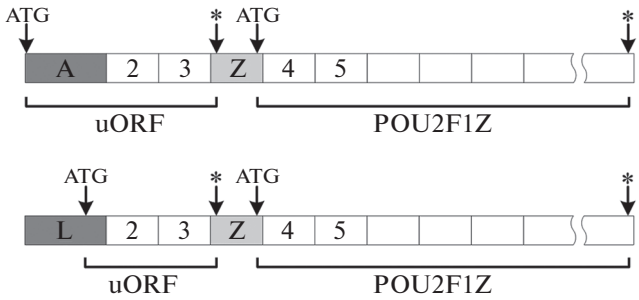


Рис. 1. Схема строения двух изоформ мРНК POU2F1, с которых транслируется одинаковый белок POU2F1Z. Экзон Z формируется из последовательности транспозона Tigger2. uORF – короткая открытая рамка считывания на 5'-конце мРНК, трансляция которой начинается с ATG-кодов альтернативных экзонов A(U) или L. Звездочкой обозначены стоп-кодоны. Начало трансляции изоформы POU2F1Z обозначено ATG в области экзона Z.

изученными изоформами *POU2F1A* и *POU2F1L, POU2F1Z* содержит дополнительный экзон Z, расположенный между экзонами 3 и 4. При сплайсинге этот экзон привносит в последовательность мРНК стоп-кодон, а следом – ATG-кодон, совпадающий с “основной” рамкой считывания белка POU2F1. Для получившейся мРНК с этого привнесенного триплета ATG синтезируется изоформа POU2F1Z с новым N-концевым доменом, а с ATG-кодона, расположенного в первом экзоне, синтезируется короткий пептид (рис. 1).

В нормальных условиях синтез этого короткого пептида (uORF) ингибирует трансляцию последующей длинной рамки считывания (белка POU2F1Z), но в условиях клеточного стресса синтез короткого пептида подавляется и активируется трансляция белка POU2F1Z [10].

Ранее мы показали, что активация трансляции POU2F1Z начинается под действием повреждающих агентов и защищает клетки от гибели [10]. Мы предполагаем, что такой механизм защиты может существенно повышать устойчивость раковых клеток к действию химиотерапевтических препаратов и немедикаментозным способам лечения злокачественных опухолей.

В данной работе мы исследовали возникновение изоформы POU2F1Z в процессе эволюции, а также провели поиск и сравнительный анализ этой изоформы у животных подтипа Craniata.

В рамках исследования происхождения экзона Z мы провели выравнивание его последовательности с геномами различных млекопитающих и обнаружили в хромосомах у разных видов довольно много мест встраивания последовательностей, имеющих значимую гомологию с экзоном Z. Мы предположили, что экзон Z может представлять собой мобильный элемент, и на следующем этапе прогнали его последовательность через базу данных мобильных элементов в GeneBank NCBI. Мы обнаружили, что экзон Z, с которого транскрибируется изоформа POU2F1Z, представляет собой фрагменты копии ДНК-транспозона Tigger2, встроившегося в ген POU2F1 между 3 и 4 экзонами, и соответствует участку 2150 – 2461 п.н. данного транспозона.

Tigger2 – это древний ДНК транспозон, который обнаруживают в геномах млекопитающих, в том числе человека. Длина полного реконструированного варианта составляет 2718 п.н. Он включает ген транспозазы (с 603 по 2483 п.н.) и фланкирован инвертированными повторами длиной 24 п.н. Полный вариант Tigger 2 в геномах млекопитающих не был обнаружен, однако повсеместно обнаруживаются различные его фрагменты [11].

Далее мы провели исследование с целью определить, в какой именно момент эволюционного развития животных подтипа Craniata Tigger 2 встроился в ген *POU2F1.*

Для этого был произведен анализ последовательностей ортологов *POU2F1* животных подтипа Craniata, содержащихся в базе данных NCBI. Всего нами было проанализировано 279 видов. Из базы данных Dfam [12] была получена скрытая марковская модель для транспозонаTigger2. При помощи HMMER (ver.3.3.2) [13] был произведен поиск фрагментов Tigger2 в полученных из NCBI последовательностях *POU2F1.* Для данного анализа мы посчитали необходимым использовать именно метод поиска, основанный на скрытых марковских моделях, реализуемый в HMMER, поскольку показано, что он более чувствителен (по сравнению с blastn и другими методами, основанными на поиске гомологий с единственной последовательностью) в задачах поиска фрагментов древних транспозонов [14].

Из базы NCBI были получены файлы с аннотациями референсных геномов попавших в нашу выборку видов. Из полученных аннотаций были извлечены фрагменты, соответствующие ортологам POU2F1. Полученные аннотации, а также результаты HMMER были наложены на соответствующие референсные сиквенсы генов.

Мы обнаружили, что изоформа POU2F1Z является примат-специфической и отсутствует у других видов животных. Кроме того, в отличие от остальных приматов, Tigger2 не был обнаружен в гене *POU2F1* долгопятов.

Мы показали, что во всех исследуемых генах *POU2F1* приматов встроенная копия Tigger2 разбита на несколько частей и имеет делецию в области 1341 (–44) – 2119 пн. В генах *POU2F1* лемуров и галаго делетированная копия Tigger2 разбита на три части, тогда как в генах *POU2F1* остальных приматов – на четыре. Известно, что кодирующая область транспозона Tigger2 расположена на

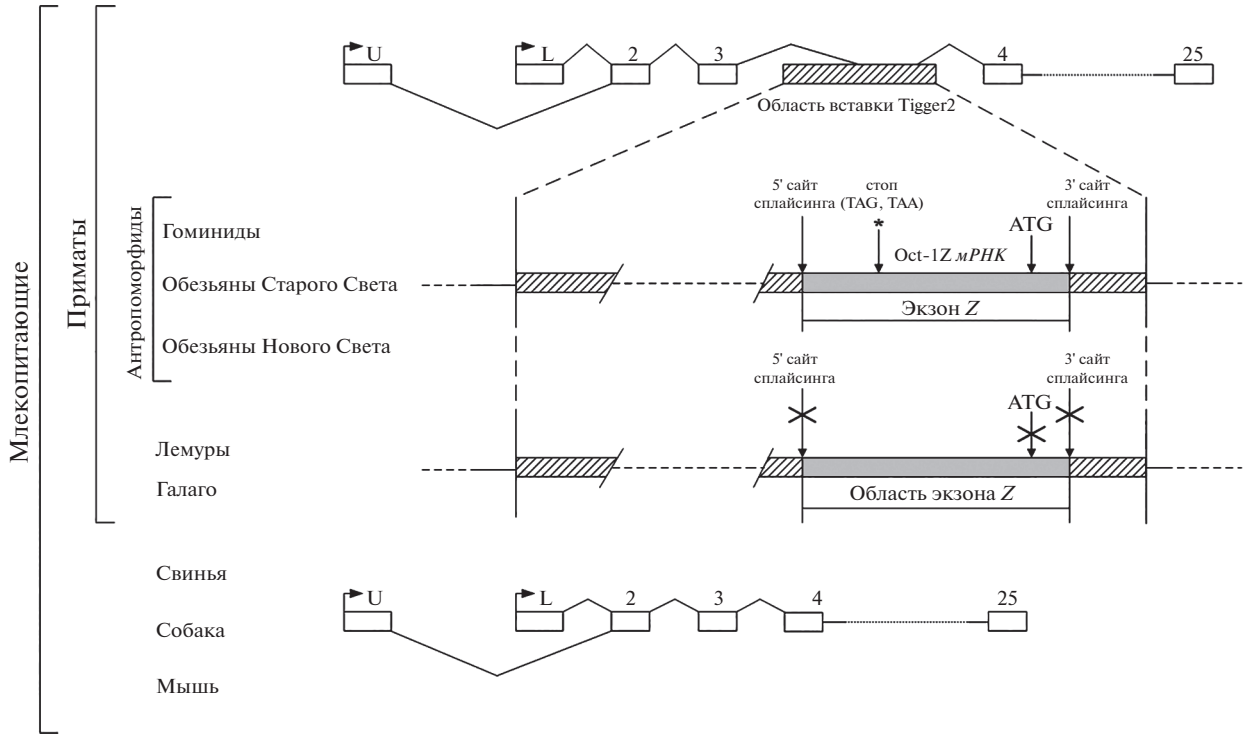


Рис. 2. Фрагмент транспозона Tigger2, встроенный в ген POU2F1. Экзоны обозначены прямоугольниками. Стрелками обозначены старты транскрипции. Линиями обозначены участки места сплайсинга. У всех приматов фрагмент Tigger2 содержит делецию (обозначено пунктиром). У всех приматов, кроме лемуров и галаго, фрагмент Tigger2 содержит сайты сплайсинга, стоп-кодон и ATG-кодон. У лемуров и галаго, несмотря на наличие фрагмента Tigger2 в гене POU2F1, образование изоформы мРНК POU2F1Z невозможно, также как и у других млекопитающих, у которых в гене POU2F1 отсутствует транспозон Tigger2.

участке 603–2483 пн, из чего следует, что попавшие в состав гена участки Tigger2 не могут кодировать полноценную транспозазу, однако могут сохранять свойства ее отдельных доменов.

На сегодняшний день в базах данных для всех приматов имеются только смоделированные версии последовательностей мРНК *POU2F1* и транслируемых с них белков. Однако, по данным моделирования, мРНК и белок изоформы POU2F1Z экспрессируются уже у макак – низших представителей обезьян Старого Света.

В дальнейшем для того, чтобы определить, происходит ли экспрессия мРНК и белка изоформы POU2F1Z в организмах приматов, мы анализировали участок копии Tigger2, встроенный в ген *POU2F1* приматов и соответствующий человеческому экзону Z.

При анализе сайтов сплайсинга экзона Z человека мы выяснили, что среди обезьян соответствующие последовательности полностью гомологичны последовательностям сайтов сплайсинга экзона Z человека, за исключением ночных обезьян, у которых в акцепторном сайте предположительного экзона Z присутствует одна нуклеотидная замена. У лемуров и галаго имеются значительные отличия от сайтов сплайсинга экзона Z человека, и можно предположить, что несмотря на наличие фрагмента Tigger2 в этой области гена, в мРНК этот участок не попадает, так как альтернативный сплайсинг этой области невозможен (рис. 2).

Также в исследуемом участке встроенной копии Tigger2 анализировали последовательности предположительных стоп-кодона и ATG-кодона на соответствие таковым в экзоне Z человека. Выяснилось, что стоп-кодоны TAG на данном участке полностью гомологичны для всех приматов, за исключением макак, у которых предположительным соответствующим стоп-кодоном является TAA (рис. 2).

Соответствующие точки начала трансляции (ATG-кодон) присутствуют у всех приматов, за исключением лемуров и галаго (рис. 2), у которых вместо ATG-кодона присутствуют триплеты CTC и GTG соответственно.

Чтобы понять, какие именно события вызвали разделение копии Tigger2 внутри гена POU2F1 на несколько частей, с помощью базы данных мобильных элементов Dfam, был проанализирован участок гена POU2F1 приматов со встроенной копией транспозона Tigger2. В результате мы обнаружили, что в процессе эволюции в копию

Tigger2 встраивались другие мобильные генетические элементы, преимущественно типа SINE. В ходе эволюции изменялось как место расположения, так и численность мобильных элементов SINE в пределах исследуемого участка. Указанные изменения происходили в исследуемых генах *POU2F1* низших приматов вплоть до макак. Расположение мобильных генетических элементов SINE, установившееся в исследуемом участке гена *POU2F1* макак, сохраняется в неизменном виде у остальных приматов – обезьян Старого Света и человека, что может свидетельствовать о его функциональной значимости.

Можно предположить, что именно на данном этапе эволюции произошло попадание участка 2150–2461 п.н. Tigger2 в кодирующую последовательность гена *POU2F1*, что повлекло за собой положительные эволюционные изменения и, в итоге, привело к образованию экзона Z.

Наши результаты показывают, что инсерция мобильного элемента стала частью функционального гена *POU2F1* приматов благодаря пошаговому процессу, который включал в себя транспозицию, утрату способности к дальнейшим перемещениям за счет встраивания внутрь Tigger2 других мобильных элементов, и последующее транскрипционное и трансляционное слияние с геном-мишенью. В нашем исследовании было показано, что новая химерная примат-специфичная изоформа *POU2F1Z* получилась в результате слияния гена фактора транскрипции *POU2F1* и фрагмента гена транспозазы мобильного элемента Tigger 2, давшего начало новому экзону гена *POU2F1* приматов.

Появление новых генов и функций имеет первостепенное значение в формировании новых видов животных. В настоящее время достаточно хорошо изучены различные типы дупликаций в образовании новых генов [15]. Гораздо менее понятным является создание новых генов за счет использования материала из “эгоистичных” мобильных генетических элементов. Анализ подобных эволюционных событий – сложная задача, потому что зачастую это результат небольших замен или структурных перестроек, функциональное значение которых трудно определить.

В случае гена *POU2F1* человека и приматов такое преобразование привело к возникновению новой изоформы POU2F1Z, которая защищает клетки от повреждающего действия клеточного стресса, но при этом создает трудности для лечения злокачественных новообразований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта российского научного фонда (грант № 19-14-00365).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vázquez-Arreguín K., Tantin D.* The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks // Biochim Biophys Acta. 2016. V. 1859. № 6. P. 792–804.
2. *Maddox J., Shakya A., South S., et al.* Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant // PLoS Genet. 2012. V. 8. P. e1003048.
3. *Sharpe D.J., Orr K.S., Moran M., et al.* POU2F1 activity regulates HOXD10 and HOXD11 promoting a proliferative and invasive phenotype in head and neck cancer // Oncotarget. 2014. V. 5. № 18. P. 8803–8815.
4. *Qian J., Kong X., Deng N., et al.* OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer // Gut. 2015. V. 64. P. 37–48.
5. *Vázquez-Arreguín K., Bensard C., Schell J.C., et al.* Oct1/Pou2f1 is selectively required for colon regeneration and regulates colon malignancy // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 5. P. e1007687.
6. *Xiao S., Liao S., Zhou Y., Jiang B., Li Y., Xue M.* High expression of octamer transcription factor 1 in cervical cancer // Oncol Lett. 2014. V. 7. P. 1889–1894.
7. *Kuzmanov A., Johansen P., Hofbauer G.* FBXO25 Promotes Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Growth and Metastasis through Cyclin D1 // J. Invest Dermatol. 2020. V.140. P. 2496–2504.
8. *Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Portseva T., Mogila V.A., Georgieva S.G.* Different N-terminal isoforms of Oct-1 control expression of distinct sets of genes and their high levels in Namalwa Burkitt’s lymphoma cells affect a wide range of cellular processes // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 19. P. 9218–9230.
9. *Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Krylova I.D., Portseva T.N., Georgieva S.G.* The regulatory interplay between Oct-1 isoforms contributes to hematopoiesis and the isoforms imbalance correlates with a malignant transformation of B cells // Oncotarget. 2018. V. 9. № 52. P. 29892–29905.
10. *Stepchenko A.G., Portseva T.N., Glukhov I.A., Kotnova A.P., Georgieva S.G., Pankratova E.V.* Primate-specific stress-induced transcription factor POU2F1Z protects human neuronal cells from stress // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 18808.
11. *Smit A.F., Riggs A.D.* Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome // Proc. № atl. Acad. Sci. U S A. 1996. V. 93. № 4. P. 1443–1448.
12. *Storer J., Hubley R., Rosen J., Wheeler T.J., Smit A.F.* The Dfam community resource of transposable element families, sequence models, and genome annotations // Mob. DNA 2021. V. 12. № 1. P. 2.
13. *Wheeler T.J., Eddy S.R.* № hmmer: DNA homology search with profile HMMs // Bioinformatics. 2013. V. 29. № 19. P. 2487–2489.
14. *Wheeler T.J., Clements J., Eddy S.R., et al.* Dfam: a database of repetitive DNA based on profile hidden Markov models // Nucleic Acids Res. 2013. P. 41.
15. *Bizzotto S., Walsh C.A.* Making a Notch in the Evolution of the Human Cortex // Dev. Cell. 2018. V. 45. № 5. P. 548–550.

THE BIRTH OF A NEW ISOFORM OF POU2F1 IN PRIMATES THROUGH THE USE OF EGOISTIC MOBILE GENETIC ELEMENTS

B. M. Lyanova[a], A. P. Kotnova[a], A. A. Makarova[a], Academician of the RAS Yu. V. Ilyin[a], Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva[a], A. G. Stepchenko[a], and E. V. Pankratova[a,#]

[a] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: panliz@mail.ru*

The emergence of new genes and functions is of paramount importance in the emergence of new animal species. Thus, the insertion of the mobile element Tigger 2 into the sequence of the functional gene POU2F1 in primates led to the formation of a new chimeric primate-specific isoform POU2F1Z, the translation of which is activated under cellular stress. Its mRNA has been found in all types of monkeys, starting with monkeys. Analysis of the fragments of the Tigger2 copy corresponding to the human exon Z showed that the splicing sites of exon Z are homologous in humans and in most monkeys, with the exception of lemurs and galago. The stop codon introduced into the mRNA by the Tigger2 sequence is present in all primates, starting with monkeys. The internal ATG codon is also present in all primates, with the exception of lemurs and galagos. In the course of evolution, other MGEs, mainly of the SINE type, were built into the Tigger2 copy. In the course of evolution, both the location and the number of mobile SINE elements within the POU2F1 gene changed. Starting with macaques, the pattern of the arrangement of SINE elements within the Tigger2 copy in the studied region of the POU2F1 gene was fixed and then remained unchanged in other primates and humans, which may indicate its functional significance.

Keywords: POU2F1 gene, mobile genetic elements, head carcinoma

EDN: PVQWRM
ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 503, с. 213–216

УДК 57.085

СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ ОРТО-ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В СПОНТАННЫХ ОПУХОЛЯХ ЖИВОТНЫХ

© 2022 г. Е. А. Лозовская[1], С. Б. Никифоров[1], А. Г. Еникеев[4], К. Ю. Костюнин[2], Н. П. Судаков[1,3], А. А. Семенов[4]

Представлено академиком РАН Б.А. Трофимовым
Поступило 10.12.2019 г.
После доработки 24.09.2021 г.
Принято к публикации 26.09.2021 г.

Впервые установлено, что в спонтанных опухолях, в особенности злокачественной мелкоклеточной опухоли молочной железы собаки и асцитной жидкости с клетками карциномы Эрлиха, содержатся ди-2-этилгексил, дибутилфталат, диэтилфталат. Предполагается, что уровень фталатов в этих клетках определяется активностью экспрессии ядерных рецепторов к эстрогенам и прогестерону, а также особенностями метаболизма ксенобиотиков. Накопление этих соединений в опухолевых клетках может способствовать усилению их злокачественности. Полученные данные могут быть использованы в создании новых диагностических и лечебных медицинских технологий.

Ключевые слова: фталаты, асцитная карцинома Эрлиха, спонтанные опухоли домашних животных

DOI: 10.31857/S2686738922010164

Сложные эфиры *орто*-фталевой кислоты (фталаты) производятся промышленностью и активно используются в медицине, являются компонентами косметических средств, пищевых упаковок, продуктов бытовой химии [1]. Фталаты выявлены также в растительных и животных организмах, где преобладают ди-2R-этилгексилфталат (ДЭГФ) и дибутилфталат (ДБФ), реже встречаются другие формы эфиров [2, 3]. Данные соединения индуцируют окислительный стресс в клетках, обладают генотоксичностью, оказывают негативное воздействие на эмбриогенез, структуру и функции печени, репродуктивную, нервную, эндокринную, дыхательную системы позвоночных животных и человека [4]. Установлены факты онкогенного воздействия фталатов, и, в то же время, их противоонкогенных эффектов [5]. При этом данные об особенностях содержания фталатов в клетках опухолей и значении их внутриклеточного накопления для канцерогенеза отсутствуют. Целью исследования являлось определение количества ДЭГФ, ДБФ и диэтилфталата (ДЭФ) в злокачественных новообразованиях и здоровых тканях животных.

В исследовании использовались наиболее распространенные спонтанные опухоли домашних животных: злокачественная мелкоклеточная опухоль молочной железы собаки, венерическая саркома собаки, плоскоклеточная папиллома кошки, дерматофиброма собаки и образцы редко встречаемых холангиокарцином собаки и кошки [6]. Также были включены в анализ клетки перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха, здоровые ткани (яичник кошки). Из исследуемых образцов, опухоль молочной железы, асцитная карцинома Эрлиха и холангиокарцинома имеют происхождение из клеток, наиболее уязвимых к канцерогенному действию фталатов [7, 8]. Взятие биологического материала опухолей и здоровых тканей осуществлялось при проведении плановых лечебных мероприятий у животных в условиях специализированной ветеринарной клиники. Культуру клеток асцитной карциномы Эрлиха,

[1] *Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия*
[2] *Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия*
[3] *Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия*
[4] *Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия*
**e-mail: molodegny31@mail.ru*

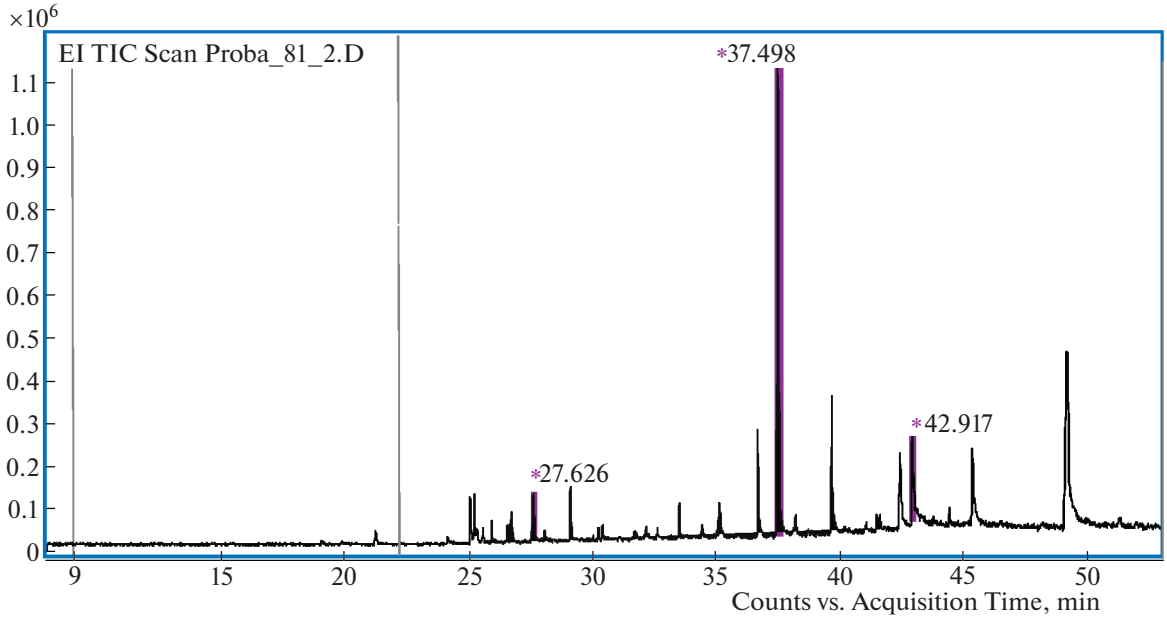


Рис. 1. Хроматограмма петролейного экстракта из злокачественной мелкоклеточной опухоли молочной железы собаки (№ 1). *Примечание*: 27.626 –дибутилфталат, 37.498 – ди-2-этилгексилфталат, 42.917 – динонилфталат (внутренний стандарт).

полученную в питомнике ГНЦ ВБ “Вектор” (Новосибирская обл., пос. Кольцово), поддерживали, перевивая в брюшную полость самцам белых беспородных мышей, в возрасте 2.0–2.5 мес. Исследование одобрено Комитетом по этике ИНЦХТ (г. Иркутск) протокол № 7 от 21.06.2012.

Для определения фталатов опухоли замораживали при –70°С, измельчали до частиц >0.5 мм,

Таблица 1. Содержание сложных эфиров фталевой кислоты в спонтанных опухолях, асцитной карциноме Эрлиха и нормальных тканях животных (мкг/г)

№	Тип ткани	ДЭГФ	ДБФ	ДЭФ
1	злокачественная мелкоклеточная опухоль молочной железы собаки	646.0–660.0	3.2–5.0	0
2	венерическая саркома собаки	26.8–30.1	16.6–20.0	1.5–2.7
3	плоскоклеточная папиллома кошки	4.0–6.2	2.2–3.0	21.4 –25.3
4	холангиокарцинома собаки	29.7–22.4	2.1–3.0	38.1– 41.1
5	дерматофиброма собаки	37.0–42.5	0	<1
6	холангиокарцинома кошки	11.1–4.2	0	1.6–2.3
7	асцитная карцинома Эрлиха*	122.0 –125.6	44.2 – 50.9	55.3 – 60.3
8	яичник кошки (норма)	7.1 – 8.2	3.1–3.9	29.5–31.0

* концентрация веществ представлена в мкг/100 мл, может стимулировать в них механизмы канцерогенеза и усиливать их злокачественные свойства. Это объективно подтверждается экспериментами *in vitro*. Показано, что добавление в культуральную среду фталатов способствует повышению пролиферативной активности раковых клеток молочной железы MCF-7, MDA-MB-231, T-47D [11–13]. При этом стимуляция злокачественных свойств данных клеток не зависит от уровня экспрессии в них рецепторов к эстрогенам и прогестерону.

лиофилизировали. Последующую подготовку проб проводили по методике [2], после чего фталаты анализировали на хроматомасс-спектрометре 7000QQQ/7890A Agilent Technologies, (USA) [3] (рис. 1). Для определения фталатов в асцитной жидкости с клетками карциномы Эрлиха, к 60 мл биологического образца добавляли ~40 мл бутанола, упаривали досуха в вакууме при 60°С. Твердый остаток измельчали, экстрагировали легким петролейным эфиром (3 × 50 мл) и определяли фталаты по вышеуказанной методике.

Установлено, что злокачественные опухоли, асцитная жидкость с клетками карциномы Эрлиха и здоровые ткани исследованных животных содержат значительные количества фталатов (табл. 1). Интересным фактом являются выявленные различия концентраций данных веществ в зависимости от вида опухоли. Наибольшее содержание ДЭГФ выявлено в образцах злокачественной мелкоклеточной опухоли молочной железы собаки и асцитной карциноме Эрлиха, имеющей первичное происхождение из ткани молочной железы человека.

Для асцитной жидкости с клетками карциномы Эрлиха характерно также наибольшее в сравнении с остальными тканями количество ДБФ и ДЭФ. Возможно, что избирательное накопление фталатов в опухолевых клетках молочной железы предопределяется повышенным уровнем экспрессии ядерных рецепторов (в частности, к эстрогенам, прогестерону), лиганд-связующие домены которых имеют сродство к фталатам [9, 10]. Нельзя также исключить влияние на внутриклеточную концентрацию фталатов особенностей их метаболизма у данных опухолей. Выявленное в данной работе избирательное накопление фталатов в опухолевых клетках может стимулировать в них механизмы канцерогенеза и усиливать их злокачественные свойства. Это объективно подтверждается экспериментами in vitro. Показано, что добавление в культуральную среду фталатов способствует повышению пролиферативной активности раковых клеток молочной железы MCF-7, MDA-MB-231, T-47D [11–13]. При этом стимуляция злокачественных свойств данных клеток не зависит от уровня экспрессии в них рецепторов к эстрогенам и прогестерону.

Таким образом, в спонтанных опухолях животных, в особенности в злокачественной мелкоклеточной опухоли молочной железы собаки, а также в асцитной жидкости с клетками карциномы Эрлиха присутствуют значительные количества диэфиров орто-фталевой кислоты, что возможно предопределяется активностью экспрессии ядерных рецепторов и особенностями метаболизма этих веществ. Повышенный уровень фталатов в опухолевых клетках может усиливать их злокачественность, что важно для развития методов новых диагностики и лечения в онкологии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в Иркутском научном центре хирургии и травматологии, Иркутском государственном медицинском университете, Лимнологическом институте СО РАН, Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) с использованием оборудования ЦКП “Биоаналитика”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Frederiksen H., Skakkebaek N.E., Andersson A.M.* // Mol. Nutr. Food Res. 2007. V. 51. P. 899–911.

2. *Shafikova T.N., Omelichkina Y.V., Boyarkina S.V., Enikeev A.G., Maksimova L.A., Semenov A.A.* // Dokl. Biol. Sci. 2019. V. 1. P. 13–15.

3. *Enikeev A.G., Semenov A.A., Permyakov A.V., Sokolova N.A., Gamburg K.Z., Dudareva L.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 294–297.

4. *Zhang H., Hua Y., Chen J., Li X., Bai X., Wang H.* // J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2018. V. 36. P. 125–144.

5. *Ahern T.P., Broe A., Lash T.L., Cronin-Fenton D.P., Ulrichsen S.P., Christiansen P.M., Cole B.F., Tamimi R.M., Sørensen H.T., Damkier P.* // J. Clin. Oncol. 2019. V. 37. P. 1800–1809.

6. *Vascellari M., Baioni E., Ru G., Carminato A., Mutinelli F.* // BMC Vet. Res. 2009. V. 5. P. 39.

7. *Konduracka E., Krzemieniecki K., Gajos G.* // Pol. Arch. Med. Wewn. 2014. V. 124. P. 264–269.

8. *Rusyn I., Peters J.M., Cunningham M.L.* // Crit. Rev. Toxicol. 2006. V. 36. 459–479.

9. *Delfosse V., Maire A.L., Balaguer P., Bourguet W.* // Acta. Pharmacol. Sin. 2015. V. 36. P. 88–101.

10. *Kulkoyluoglu-Cotul E., Arca A., Madak-Erdogan Z.* // Trends Endocrinol. Metab. 2019. V. 30. P. 25–38.

11. *Kim I.Y., Han S.Y., Moon A.* // J Toxicol Environ Health A. 2004. V. 67. P. 2025–2035.

12. *Hsieh T.H., Tsai C.F., Hsu C.Y., Kuo P.L., Lee J.N., Chai C.Y., Wang S.C., Tsai E.M.* // FASEB J. 2012 V. 26. P. 778–787.

13. *Crobeddu B., Ferraris E., Kolasa E., Plante I.* // Environ. Res. 2019 V. 173. P. 165–173.

COMPLEXES OF ORTHOTHALIC ACID IN SPONTANEOUS ANIMAL TUMORS

E. A. Lozovskaya[a,#], S. B. Nikiforov[a], A. G. Enikeev[d], K. Yu. Kostyunin[b], N. P. Sudakov[a,c], and A. A. Semenov[d]

[a] *Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russian Federation*

[b] *Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation*

[c] *Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

[d] *Siberian Institute of Plants Physiologies and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: molodegny31@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS B.A. Trofimov

Presence of diethyl-, dibutyl- and 2-ethylhexylphthalates in spontaneous animal's tumors is determined at the first time. Small-cell breast cancer of dog and carcinoma Erlich ascitic liquid with the cells are particularly rich of this substances. It is assumed that the level of phthalates in these cells is due to the activity of expression of nuclear receptors to estrogens and progesterone, as well as the peculiarities of the metabolism of xenobiotics. The accumulation of these compounds in tumor cells can cause the increase of their malignancy. The data obtained can be used for development of new diagnostic and therapeutic technologies.

Keywords: phthalates, carcinoma Erlich ascitic liquid, spontaneous animal's tumors