СОДЕРЖАНИЕ

Том 497, 2021

Ископаемый большехвостый дикобраз *Atherurus macrourus* (Hystricidae, Rodentia) из северного Вьетнама (пещера Буд, рубеж плейстоцена и голоцена)

А. В. Лопатин, Н. В. Сердюк 113

Смена зубов у Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) из плейстоцена Кубы

А. В. Лопатин 118

Аномалии зубной системы у Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) из плейстоцена Кубы

А. В. Лопатин 125

Органические соединения олова в бурой водоросли *Saccharina latissima* Баренцева моря

Л. О. Метелькова, З. А. Жаковская, Г. И. Кухарева, Г. М. Воскобойников, Г. Г. Матишов 131

Мутантные мыши *wal* имеют мутацию, ассоциированную с расстройствами аутистического спектра

Э. С. Чермных, Д. М. Щепетов, Е. А. Воротеляк 135

Влияние естественной асимметричной эмбриональной зрительной афферентации на активацию нейронов каудомедиального мезопаллиума при реакции затаивания у незрелорождающихся птенцов

Е. В. Корнеева, А. А. Тиунова, Л. И. Александров, Т. Б. Голубева 139

Продуктивность и динамика морфологических и физиолого-биохимических параметров картофеля в условиях засушливого климата

О. А. Розенцвет, Е. С. Богданова, В. Н. Нестеров, С. Н. Шевченко, А. Л. Бакунов, А. В. Милехин, С. Л. Рубцов 143

Периодическая “спонтанная” активность животных определяется квазиритмическим фактором внешней среды?

М. Е. Диатроптов, А. В. Суров 148

Синхронное пение птиц, случайное совпадение или акустические взаимодействия

М. Я. Горецкая, С. В. Огурцов, М. А. Сёмина, П. А. Козлова, В. Д. Салова, П. О. Калитина, Д. Б. Бурыкин, И. Р. Бёме 152

Ангиогенные эффекты анксиолитика фабомотизола

С. А. Крыжановский, Т. А. Антипова, М. Б. Вититнова, С. В. Николаев, А. Д. Дурнев 156

Факторы иммуносупрессии PD-1, PD-L1, IDO1 и колоректальный рак

О. В. Ковалева, М. А. Рашидова, А. Н. Грачев, В. В. Масленников, И. В. Булычева, Е. С. Герштейн, Е. А. Короткова, Н. Ю. Соколов, З. З. Мамедли, Н. Е. Кушлинский 160

Формирование уникальной популяции CD8+ Т-лимфоцитов при введении сингенных спленоцитов мышам с лимфопенией

Ю. Ю. Силаева, А. А. Калинина, Л. М. Хромых, А. В. Дейкин, Д. Б. Казанский 165

Изменение микробиома молока коров при заболевании маститом

К. К. Фурсова, С. Л. Соколов, М. П. Щанникова, Д. А. Никанова, О. А. Артемьева, Е. Н. Колодина, А. С. Сорокин, Т. Р. Джелядин, И. В. Шульчева, А. О. Шепеляковская, А. Зиновьева, Ф. А. Бровко 169

Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией, модифицированные полисиаловой кислотой, для визуализации солидных опухолей *in vivo*

П. А. Демина, Н. В. Шолина, Р. А. Акасов, Д. А. Хоченков, А. В. Нечаев, И. В. Балалаева, Е. В. Хайдуков, А. Н. Генералова, С. М. Деев 175

Продукция цитокинов биоптатом опухоли на разных патологических прогностических стадиях при раке молочной железы

А. И. Аутеншлюс, А. А. Студеникина, Н. А. Вараксин, В. В. Ляхович 180

Дифференцировка нейробластомы IMR32 сопровождается глобальным изменением транскриптома

А. Г. Степченко, Т. Н. Порцева, Ю. В. Ильин, С. Г. Георгиева, Е. В. Панкратова 185

Механизм увеличения реабсорбции осмотически свободной воды в почке крыс при окситоциновом салурезе

Ю. В. Наточин, Е. И. Шахматова, А. Е. Боголепова 190

Влияние хирургической травматизации в полости носа на экспрессию белка P53 в гиппокампе крыс

И. В. Кастыро, И. В. Решетов, Г. В. Хамидулин, С. С. Шилин, В. И. Торшин, М. Г. Костяева, В. И. Попадюк, Т. Ю. Юнусов, П. Е. Шмаевский, К. П. Шаламов, А. Купрякова, Е. С. Дорогинская, А. Д. Седельникова 194

Оценка цитотоксичности пептидных модификаций доксорубицина на *Tetrahymena pyriformis*

А. Н. Позднякова, Е. Г. Черемных, О. Ю. Соколов, Н. В. Кост, К. В. Шевченко, В. П. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. А. Андреева, Н. Ф. Мясоедов 199

Исследование роли слухопротезирования в формировании площади акустического поля гласных

А. Н. Коваленко, И. В. Кастыро, И. В. Решетов, В. И. Попадюк 204

CTCF человека взаимодействует с CP190 дрозофилы, но не с Kaiso

К. Ю. Халисова, П. Г. Георгиев, А. Н. Бончук 209

Находка раннеплиоценовых окаменелостей трехпалой лошади (*Hipparion tchicoicum* Ivanjev, 1966) в Западном Забайкалье

Н. П. Калмыков 213

CONTENTS

Vol. 497, 2021

Fossil Asiatic brush-tailed porcupine *Atherurus macrourus* (Hystricidae, Rodentia) from northern Vietnam (Bud cave, Pleistocene – Holocene transition)

A. V. Lopatin and N. V. Serdyuk 113

Dental Replacement in Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) from the Pleistocene of Cuba

A. V. Lopatin 118

Dentition Anomalies in Nesophontidae (Lipotyphla, Mammalia) from the Pleistocene of Cuba

A. V. Lopatin 125

Organotin Compounds (OTs) in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) from the Barents sea

L. O. Metelkova, Z. A. Zhakovskaya, G. I. Kukhareva, G. M. Voskoboinikov, and G. G. Matishov 131

Mutant wal Mice have Mutation Associated with Autism Spectrum Disorders

E. S. Chermnykh, D. M. Schepetov, and E. A. Vorotelyak 135

Influence of Natural Asymmetric Embryonic Visual Afferentation on the Neuronal Activations in Caudomedial Mesopallium During the Freezing Response in Altricial Nestling

E. V. Korneeva, A. A. Tiunova, L. I. Alexandrov, and T. B. Golubeva 139

Productivity and Dynamics of Morphological and Physiological-biochemical Parameters of Potatoes under Aroid Climate

O. A. Rozentsvet, E. S. Bogdanova, V. N. Nesterov, S. N. Shevchenko, A. L. Bakunov, A. V. Milekhin, and S. L. Rubtsov 143

Is Periodic "Spontaneous" Activity of Animals is Determined by a Quasi-Rhythmic Factor of the External Environment?

M. E. Diatroptov, A. V. Surov 148

Birdsong Overlapping, Random Coincidence or Acoustic Interactions

M. Goretskaia, S. Ogurtsov, M. Syomina, P. Kozlova, V. Salova, P. Kalitina, D. Burygin, and I. Beme 152

Angiogenic Effects of Anxiolytic Fabomatizole

S. A. Kryzhanovskii, T. A. Antipova, M. B. Vititnova, S. V. Nikolaev, and A. D. Durnev 156

Immunosuppression Factors PD-1, PD-l1, IDO1 and Colorectal Cancer

O. V. Kovaleva, M. A. Rashidova, A. N. Gratchev, V. V. Maslennikov, I. V. Boulitcheva, E. S. Gershtein, E. A. Korotkova, N. Yu. Sokolov, V. V. Delektorskaya, Z. Z. Mamedli, and N. E. Kushlinskii 160

Formation of a Unique Population of CD8 + T-lymphocytes after Adoptive Transfer of Syngeneic Splenocytes to Mice with Lymphopenia

Yuliya Yu. Silaeva, Anastasia A. Kalinina, Ludmila M. Khromykh, Alexey V. Deykin, and Dmitry B. Kazansky 165

Changes in the Microbiome of Milk in Cows with Mastitis

K. K. Fursova, S. L. Sokolov, M. P. Shchannikova, D. A. Nikanova, O. A. Artem'eva, E. N. Kolodina, A. S. Sorokin, T. R. Dzhelyadin, I. V. Shulcheva, A. O. Shepelyakovskaya, N. A. Zinovieva, and F. A. Brovko 169

Upconversion Nanoparticles Decorated with Polysialic Acid, for Solid Tumors Visualization *in vivo*

P. A. Demina, N. V. Sholina, R. A. Akasov, D. A. Khochenkov, A. V. Nechaev, I. V. Balalaeva, E. V. Khaydukov, A. N. Generalova, and S. M. Deev 175

Cytokine Production by Tumor Bioptate at Different Pathological Prognostic Stages in Breast Cancer

A. I. Autenshlyus, A. A. Studenikina, N. A. Varaksin, and V. V. Lyakhovich 180

Differentiation of IMR32 Neuroblastoma is Accompanied by a Global Change in the Transcriptome

A. G. Stepchenko, T. N. Portseva, Yu. V. Ilyin, S. G. Georgieva, and E. V. Pankratova 185

The Mechanism of the Solute-free Water Reabsorption Increase in the Rat Kidney by Oxytocin Saluresis

Yu. V. Natochin, E. I. Shakhmatova, and A. E. Bogolepova 190

Influence of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Expression of p53 Protein in the Hippocampus of Rats

I. V. Kastyro, I. V. Reshetov, G. V. Khamidulin, S. S. Shilin, V. I. Torshin, M. G. Kostyaeva, V. I. Popadyuk, T. Y. Yunusov, P. E. Shmaevsky, K. P. Shalamov, A. D. Kupryakova, E. S. Doroginskaya, and A. D. Sedelnikova 194

Assessment of the Cytotoxicity of Peptide Modifications of Doxorubicin on *Tetrahymena pyriformis*

A. N. Pozdnyakova, E. G. Cheremnykh, O. Yu. Sokolov, N. V. Kost, K. V. Shevchenko, V. P. Shevchenko, I. Yu. Nagaev, L. A. Andreeva, and N. F. Myasoedov 199

Study of the Role of Hearing Aid on the Area of the Acoustic Field of Vowels

A. N. Kovalenko, I. V. Kastyro, I. V. Reshetov, V. I. Popadyuk 204

Human CTCF Interacts with Drosophila CP190, but not with Kaiso

K. Y. Khalisova, P. G. Georgiev, and A. N. Bonchuk 209

Find of Early Pliocene Fossils of Horses (*Hipparion tchicoicum* Ivanjev, 1966) In The Western Transbaikalie

N. P. Kalmykov 213

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 113–117

УДК 569.324.3:551.793(597)

ИСКОПАЕМЫЙ БОЛЬШЕХВОСТЫЙ ДИКОБРАЗ *ATHERURUS MACROURUS* (HYSTRICIDAE, RODENTIA) ИЗ СЕВЕРНОГО ВЬЕТНАМА (ПЕЩЕРА БУД, РУБЕЖ ПЛЕЙСТОЦЕНА И ГОЛОЦЕНА)

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин[1,*], Н. В. Сердюк[1,2]

Поступило 01.10.2020 г.
После доработки 31.10.2020 г.
Принято к публикации 31.10.2020 г.

Из пограничных плейстоцен-голоценовых отложений пещеры Буд в северном Вьетнаме описаны нижнечелюстные и зубные остатки кистехвостого дикобраза. По средним значениям длины щечных зубов этот дикобраз несколько крупнее современного *Atherurus macrourus* (Linnaeus, 1758), но немного уступает плейстоценовому *A. karnuliensis* Lydekker, 1886; сравнительно мелкие резцы позволяют отнести форму из пещеры Буд к *A. macrourus*. Это первая во Вьетнаме ископаемая находка данного вида.

Ключевые слова: Atherurus macrourus, *A. karnuliensis*, Hystricidae, Rodentia, кистехвостые дикобразы, поздний плейстоцен, ранний голоцен, Вьетнам

DOI: 10.31857/S2686738921020177

В современной фауне кистехвостые дикобразы рода *Atherurus* представлены двумя видами – африканским *A. africanus* Gray, 1842 и азиатским *A. macrourus* (Linnaeus, 1758). Большехвостый дикобраз *A. macrourus* ныне обитает на востоке Индии, в Бангладеш, Бутане, южном Китае, Мьянме, Таиланде, Лаосе, Камбодже, Вьетнаме и полуостровной Малайзии [1–3]. Плейстоценовые находки *A. macrourus* (или *A.* cf. *macrourus*) указаны из Малайзии [4], Таиланда [5] и Китая [6, 7]. Кроме того, из плейстоцена Индии, Китая и Вьетнама известен вымерший вид *A. karnuliensis* Lydekker, 1886, который характеризуется более крупными размерами зубов по сравнению с *A. macrourus* [8]. Синонимом *A. karnuliensis* иногда считается *Sivacanthion complicatus* Colbert, 1933 из среднего миоцена Сиваликских холмов в Индии [9]; однако данное предположение невозможно принять в связи с усложненным строением коренных зубов и древним возрастом последнего. Находки *A. karnuliensis* довольно редки, представлены небольшим числом нижнечелюстных фрагментов, изолированных щечных зубов и резцов. Во Вьетнаме восемь изолированных зубов этого вида, первоначально отнесенные к *A. macrourus* [10], известны из плейстоценовых отложений пещеры Лангчанг (Lang Trang) [8, 10].

Ниже описаны остатки кистехвостых дикобразов из пещеры Буд в северном Вьетнаме, собранные в марте 2020 г. экспедиционным отрядом Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН). Пещера находится в уезде Тхатьтхань (Thạch Thành) провинции Тханьхоа (координаты 20°20'29" с.ш., 105°12'21" в.д., высота 160 м над уровнем моря); палеонтологические раскопки в ней проводились впервые.

Шурф глубиной 85 см вскрывает шесть слоев, включая скальное основание дна пещеры (сверху вниз; данные Е.Н. Мащенко, ПИН). Слой 1 представлен темно-коричневыми суглинками с большим количеством мелкого известкового щебня (мощность 5–7 см). Слой 2 – коричнево-серые суглинки с редкими включениями обломочного материала (мощность 15–35 см). Слой 3 – коричнево-серые суглинки с большим количеством грубообломочного материала (мощность 25–27 см); в слое встречаются древесные угли и угольные примазки. Слой 4 представлен ожелезненными коричневато-зелеными суглинками (мощность 20–23 см) с включениями грубообломочного материала, древесными углями и раковинами пресноводных брюхоногих моллюсков семейства Pachychilidae: *Sulcospira* cf. *quangtriensis* Köhler et al., 2009 и *Sulcospira* cf. *collyra* Köhler et al., 2009 (определение П.Ю. Пархаева, ПИН). Слой 5 – коричневые суглинки (мощность 15–20 см) с грубообломоч-

[1] *Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, Россия*

[2] *Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам*

**e-mail: alopat@paleo.ru*

Рис. 1. *Atherurus macrourus* (Linnaeus, 1758): а – экз. ПИН, № 5793/1, фрагмент I^1 с лабиальной стороны; б – экз. ПИН, № 5793/2, правый I_1 с лабиальной стороны; Вьетнам, провинция Тханьхоа, уезд Тхатьтхань, пещера Буд; верхний плейстоцен – нижний голоцен.

ными карбонатными включениями и раковинами тех же видов Pachychilidae, что и в слое 4.

Описываемые ископаемые остатки дикобразов найдены в основании слоя 4, непосредственно у его нижней границы, откуда были взяты образцы древесного угля для радиоуглеродного датирования. Полученная по древесному углю радиоуглеродная дата – 10230 ± 30 л.н. (BP), $IGAN_{AMS}$ – 8123. Калиброванный возраст [11] – 11770–12000 cal BP (стандартное отклонение 2σ, вероятность 95.4%), медианная вероятность – 11885 cal BP (ЦКП "Лаборатория радиоуглеродного датирования и электронной микроскопии" Института географии РАН, Москва, Россия, и Центра прикладных изотопных исследований Университета Джорджии, Атенс, США).

Терминология зубных структур по [12]. Размеры в мм. Обозначения измерений: LD – продольный диаметр, TD – поперечный диаметр, L – наибольшая длина, OL – длина по жевательной поверхности, OW – ширина по жевательной поверхности, EH – лабиальная эмалевая высота коронки, IH – лингвальная эмалевая высота коронки, HH – высота гипостриида, HII – высота переднего мезофлексида, HIII – высота заднего мезофлексида; *n* – число экземпляров, μ – среднее значение.

Образцы хранятся в коллекции ПИН, г. Москва. Материал включает фрагмент I^1 (экз. ПИН, № 5793/1), почти целый I_1 (экз. ПИН, № 5793/2), фрагмент нижнечелюстной кости с I_1, P_4–M_1 и M_3 (экз. ПИН, № 5793/3) и фрагмент нижнечелюстной кости с P_4–M_2 (экз. ПИН, № 5793/4). Для сравнения использованы фотографии экземпляров *A. macrourus* из коллекций Зоологического музея Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (ЗМ МГУ), Москва, Россия, и Зоологического музея Университета Малайя (ЗМ УМ), Куала-Лумпур, Малайзия.

Размеры I^1 (экз. ПИН, № 5793/1; рис. 1а): LD – 4.6, TD – 3.0. Для верхних резцов *A. karnuliensis* приводятся [8] следующие размеры (*n* = 1): LD – 4.5, TD – 3.4; для взрослых современных *A. macrourus* (*n* = 17): LD – 3.1–4.7 (μLD – 4.3), TD – 2.5–3.0 (μTD – 2.8).

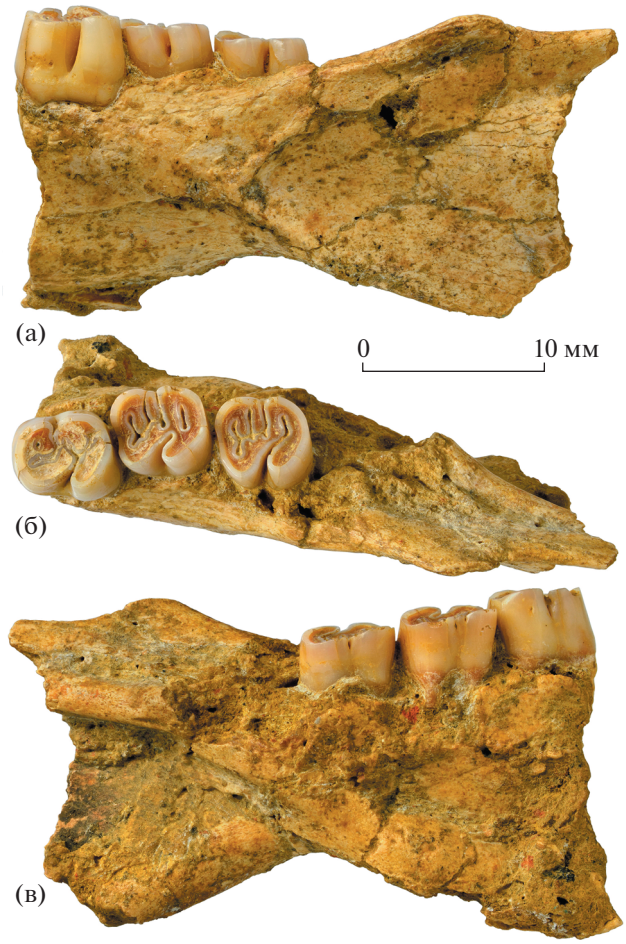

Рис. 2. *Atherurus macrourus* (Linnaeus, 1758): экз. ПИН, № 5793/4, фрагмент левой нижнечелюстной кости с P_4–M_2: а – с лабиальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – с лингвальной стороны; Вьетнам, провинция Тханьхоа, уезд Тхатьтхань, пещера Буд; верхний плейстоцен – нижний голоцен.

Нижнечелюстная кость (экз. ПИН, № 5793/4; рис. 2) характерного для кистехвостых дикобразов строения, с глубокой массетерной впадиной, крайне редуцированным венечным отростком, длинным альвеолярным бугром нижнего резца, дистально достигающим уровня M_3.

Размеры I_1: LD – 4.0, TD – 3.0 (экз. ПИН, № 5793/2; рис. 1 б); TD – 2.8 (экз. ПИН, № 5793/3). Для нижних резцов *A. karnuliensis* указаны [8] следующие размеры (*n* = 2): LD – 3.9–4.0, TD – 3.2–3.7; для взрослых современных *A. macrourus* (*n* = 18): LD – 3.4–4.3 (μLD – 3.9), TD – 2.5–3.3 (μTD – 2.8).

Брахиодонтные нижние щечные зубы на экз. ПИН, № 5793/4 сравнительно слабо стертые, на экз. ПИН, № 5793/3 стерты существенно силь-

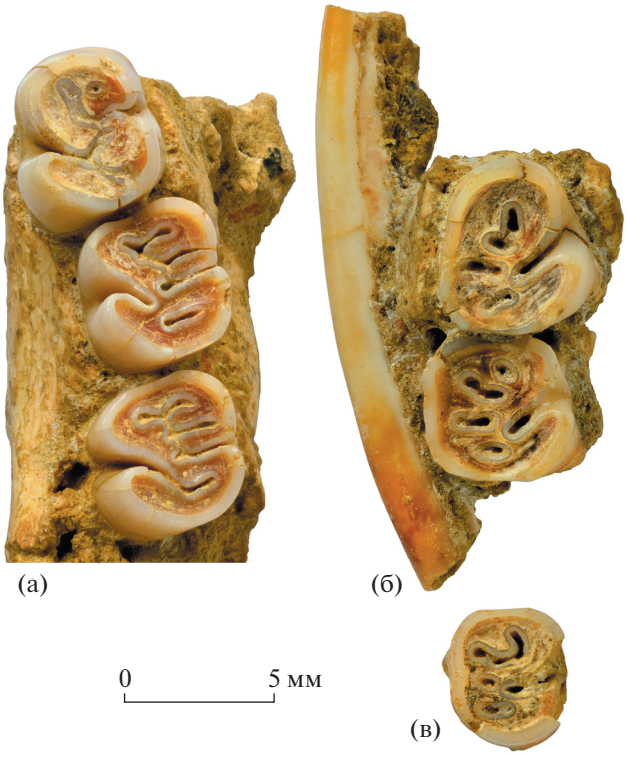

Рис. 3. *Atherurus macrourus* (Linnaeus, 1758): а – экз. ПИН, № 5793/4, левые P_4–M_2; б, в – экз. ПИН, № 5793/3, фрагмент правой нижнечелюстной кости с I_1, P_4–M_1 и обособленным M_3: б – I_1 и P_4–M_1, в – M_3; Вьетнам, провинция Тханьхоа, уезд Тхатьтхань, пещера Буд; верхний плейстоцен – нижний голоцен.

нее (рис. 3). На P_4 экз. ПИН, № 5793/4 гипофлексид примыкает к замкнутому постерофоссеттиду. Антерофоссеттид замкнут в маленький эмалевый островок. Лабиальный мезофоссеттид объединен с открывающимся на лингвальной стороне коротким передним мезофлексидом, внутри которого у устья находится небольшой столбик. Задний мезофоссеттид в виде маленького эмалевого островка. На сильно стертом P_4 экз. ПИН, № 5793/3 замкнуты и разобщены все лингвальные складки, включая задний мезофоссеттид. Размеры P_4: L – 5.7, OL – 5.2, W – 5.1, OW – 4.1, EH – 4.6, HH – 2.7, IH – 4.2, HII – 1.3, отношение EH/OL – 88.5% (экз. ПИН, № 5793/4); L – 5.9, OL – 5.6, W – 5.3, OW – 4.7, EH – 3.0, HH – 0.5, отношение EH/OL – 53.5% (экз. ПИН, № 5793/3).

На M_1 (экз. ПИН, № 5793/4) передний мезофлексид и задний мезофлексид открытые, с узкими устьями; в лабиальной части эти складки сближены друг с другом, соприкасаются эмалевыми стенками. Лабиальный мезофоссеттид соединен в центральной части с антерофоссетидом, дистальнее переходит в передний мезофлексид. Постерофоссеттид замкнутый, изолирован от гипофлексида. На сильнее стертом M_1 (экз. ПИН, № 5793/3) все лингвальные складки, включая задний мезофоссеттид, преобразованы в обособленные друг от друга замкнутые эмалевые островки. Гипофлексид на стадии, непосредственно предшествующей замыканию, его устье сильно выположено, гипостриид едва выражен. Имеется обширная задняя контактная площадка. Размеры M_1: OL – 5.0, W – 4.9, OW – 4.5, HH – 1.6, IH – 3.3, HII – 0.4, HIII – 0.7 (экз. ПИН, № 5793/4); OL – 5.0, OW – 5.0, EH – 3.0, HH – 0.1, IH – 2.5, отношение EH/OL – 60% (экз. ПИН, № 5793/3).

На M_2 (экз. ПИН, № 5793/4) глубокий гипофлексид соединен с постерофоссеттидом. Задний мезофлексид открытый, имеет отчетливое узкое устье. Остальные эмалевые складки замкнутые. Лабиальный мезофоссеттид соединен в центральной части с антерофоссетидом, а дистально связан с передним мезофоссеттидом. Передний мезофоссетид и задний мезофлексид сближены, соприкасаются эмалевыми стенками в лабиальной части. Задняя контактная площадка мелкая, смещена лингвально. Размеры M_2 (экз. ПИН, № 5793/4): OL – 5.0, W – 5.0, OW – 4.3, HH – 1.9, IH – 3.2, HIII – 0.6.

На сильно стертом M_3 (экз. ПИН, № 5793/3) все лингвальные фоссеттиды замкнутые, мелкие. Передний мезофоссеттид и лабиальный мезофоссеттид соединены. Гипофлексид глубокий, тесно примыкает к заднему мезофоссеттиду и постеро-

фоссеттиду. На передней стороне маленькая контактная площадка. Имеется три корня – два небольших передних и широкий задний. Размеры M_3 (экз. ПИН, № 5793/4): OL – 4.5, EH – 3.0, IH – 2.5; отношение EH/OL – 66.5%.

Размеры M_{1-2} у *A. karnuliensis* по [8]: OL – 4.6–5.5 (μOL – 5.1, n = 6), отношение EH/OL – 63–91% (μEH/OL – 76%, n = 6); у современных *A. macrourus*: 3.7–5.5 (μOL – 4.8, n = 44), отношение EH/OL – 47–94% (μEH/OL – 71%, n = 36).

Можно видеть, что длина (OL) нижних моляров кистехвостых дикобразов из пещеры Буд (5.0) находится в зоне перекрытия интервалов изменчивости длины M_{1-2} *A. karnuliensis* и *A. macrourus* (4.6–5.5), чуть ближе к среднему значению для *A. karnuliensis* (5.1), чем к таковому для *A. macrourus* (4.8). Однако мелкие размеры резцов свидетельствуют, что изученные ископаемые экземпляры относятся к *A. macrourus*, а не к *A. karnuliensis*.

Это первая во Вьетнаме ископаемая находка *Atherurus macrourus*. Современное распространение большехвостого дикобраза во Вьетнаме охватывает большую часть территории страны [13, с. 45; 14, рис. 423].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Е.Н. Мащенко, А.А. Лозовскому (ПИН) и Ле Суан Даку (Le Xuan Dac, Институт тропической экологии Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (Тропического центра), Ханой, Вьетнам) за участие в сборах материалов в 2020 г., А.Н. Кузнецову и С.П. Кузнецовой (Тропический центр) за помощь в организации экспедиции, А.М. Кузнецову и С.В. Багирову (ПИН) за помощь в подготовке фотографий, С.В. Крускопу (ЗМ МГУ) и Лим Цзе Чену (Lim Tze Tschen, ЗМ УМ) за предоставленные фотографии музейных образцов, Э.П. Зазовской (Институт географии РАН, Москва) за проведение радиоуглеродной датировки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Weers D.J. van.* Notes on southeast Asian porcupines (Hystricidae, Rodentia). II. On the taxonomy of the genus *Atherurus* F. Cuvier, 1829 // Beaufortia. 1977. V. 26. № 336. P. 205–230.
2. *Molur S., Srinivasulu C., Srinivasulu B., et al.* Status of South Asian non-volant small mammals: Conservation Assessment and Management Plan (C.A.M.P.) workshop report. Coimbatore, India: Zoo Outreach Organisation / CBSG-South Asia; 2005.
3. *Dhendup T., Dorji R.* First record of the Asiatic brush-tailed porcupine *Atherurus macrourus* Linnaeus, 1758 (Mammalia: Rodentia: Hystricidae) from western Bhutan // Journal of Threatened Taxa. 2017. V. 9. № 11. P. 10959–10960.
4. *Ibrachim Y.K., Lee C.P., Muhammad R.F., et al.* Vertebrate fossils from Badak Cave C, Lenggong, Perak in Peninsular Malaysia // Warta Geologi. 2010. V. 36. № 2. P. 137.
5. *Conrad C., Van Vlack H.G., Marwik B., et al.* Summary of vertebrate and molluscan assemblages excavated from late-Pleistocene and Holocene deposits at Khao Toh Chong Rockshelter, Krabi, Thailand // The Thailand Natural History Museum Journal. 2013. V. 7. № 1. P. 11–22.
6. *Chen G.-J., Wang W., Mo J.-Y., et al.* Pleistocene vertebrate fauna from Wuyun cave of Tiandong county, Guangxi // Vertebrata PalAsiatica. 2002. V. 40. № 1. P. 42–51.
7. *Chen S., Pei J., Yi J., et al.* Preliminary report on the mammalian fauna from Yumidong cave, Wushan, Chongqing, and its chronological analysis // Quaternary Sciences. 2017. V. 37. № 4. P. 845–852.
8. *Weers D.J. van. Atherurus karnuliensis* Lydekker, 1886, a Pleistocene brush-tailed porcupine from India, China and Vietnam // Paläontologische Zeitschrift. 2002. V. 76. № 1. P. 29–33.
9. *Weers D.J. van.* A taxonomic revision of the Pleistocene *Hystrix* (Hystricidae, Rodentia) from Eurasia with notes on the evolution of the family // Contributions to Zoology. 2005. V. 74. № 3/4. P. 301–312.
10. *Long V.T., De Vos J., Ciochon R.L.* The fossil mammal fauna of the Lang Trang caves, Vietnam, compared with Southeast Asian fossil and recent mammal faunas: the geographical implications // Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association. 1996. V. 14. P. 101–109.
11. *Reimer P. J., Austin W.E.N., Bard E., et al.* The IntCal20 Northern Hemisphere radiocarbon age calibration curve (0–55 cal kBP) // Radiocarbon. 2020. V. 62. № 4. P. 725–757.
12. *Lopatin A.V., Tesakov A.S., Titov V.V.* Late Miocene – early Pliocene porcupines (Rodentia, Hystricidae) from south European Russia // Russian Journal of Theriology. 2003. V. 2. № 1. P. 26–32.
13. *Lunde D., Nguyen T.S.* An identification guide to the rodents of Viet Nam. New York: American Museum of Natural History; 2001.
14. *Кузнецов Г.В.* Млекопитающие Вьетнама. М.: Т-во научных изданий КМК; 2006.

FOSSIL ASIATIC BRUSH-TAILED PORCUPINE *ATHERURUS MACROURUS* (HYSTRICIDAE, RODENTIA) FROM NORTHERN VIETNAM (BUD CAVE, PLEISTOCENE – HOLOCENE TRANSITION)

Academician of the RAS A. V. Lopatin[a,#] and N. V. Serdyuk[a,b]

[a] *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[b] *Joint Russian-Vietnamese Tropical Scientific and Technological Center, Hanoi, Vietnam*

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

The lower jaw and dental remains of a brush-tailed porcupine are described from the Pleistocene-Holocene boundary deposits of the Bud cave in northern Vietnam. In terms of the average length of the cheek teeth, this porcupine is somewhat larger than the modern *Atherurus macrourus* (Linnaeus, 1758), but slightly smaller than the Pleistocene *A. karnuliensis* Lydekker, 1886; relatively small incisors make it possible to assign the form from Bud cave to *A. macrourus*. The finding is the first fossil record of this species in Vietnam.

Keywords: Atherurus macrourus, *A. karnuliensis*, Hystricidae, Rodentia, brush-tailed porcupines, Late Pleistocene, Early Holocene, Vietnam

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 118–124

УДК 569.33:551.793(729.1)

СМЕНА ЗУБОВ У NESOPHONTIDAE (LIPOTYPHLA, MAMMALIA) ИЗ ПЛЕЙСТОЦЕНА КУБЫ

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин*

Поступило 11.11.2020 г.
После доработки 21.11.2020 г.
Принято к публикации 22.11.2020 г.

На материалах по *Nesophontes major* Arredondo, 1970 и *N. micrus* Allen, 1917 из пещеры Эль-Аброн (Республика Куба, провинция Пинар-дель-Рио, поздний плейстоцен) впервые для Nesophontidae обнаружено наличие молочных премоляров и установлена смена C^1, P^2, P^4, I_1, I_2, I_3, P_2 и P_4. В онтогенезе смена зубов (кроме P^1 и P_1) происходила после прорезывания моляров, но до достижения животным взрослых размеров. По характеру процесса зубной смены незофонтиды отличаются от большинства представителей Lipotyphla и сближаются с Solenodontidae.

Ключевые слова: Nesophontes, Nesophontidae, молочные премоляры, смена зубов, поздний плейстоцен, Куба

DOI: 10.31857/S2686738921020189

Незофонты (Nesophontidae) известны в ископаемой летописи островов Карибского региона с позднего плейстоцена до позднего голоцена. Последние представители этого эндемичного семейства насекомоядных вымерли около 500 лет назад [1, 2].

В настоящее время морфологически хорошо обоснована валидность семи видов *Nesophontes*: *N. edithae* Anthony, 1916 (Пуэрто-Рико, Вьекес, Сент-Джон, Сент-Томас), *N. zamicrus* Miller, 1929, *N. paramicrus* Miller, 1929 (Гаити), *N. hypomicrus* Miller, 1929 (Гаити, Гонав), *N. major* Arredondo, 1970 (Куба), *N. micrus* Allen, 1917 (Куба, Хувентуд) и *N. hemicungulus* Morgan et al., 2019 (Кайман-Брак, Большой Кайман) [3–5]. Эти выводы согласуются с новейшими результатами протеомного анализа [6] и молекулярно-генетических исследований [7].

Незофонты известны по многочисленным ископаемым и субфоссильным остаткам из пещерных местонахождений. В некоторых местах найдены остатки сотен особей, включая многочисленные черепные и нижнечелюстные фрагменты с зубами [4, 8]. При этом некоторые характеристики зубной системы незофонтов остаются плохо изученными. В частности, до настоящего времени имелось очень мало сведений о смене и порядке прорезывания зубов у незофонтов [4, 9, 10], полностью отсутствовали данные о молочных премолярах.

Г. Энтони [9, с. 74] отметил наличие субпремолярифорнного молочного нижнего клыка (DC_1) у молодой половозрелой особи *N. edithae*. У этого экземпляра в одной альвеоле с DC_1 находится постоянный клык (C_1), вершина которого видна у основания молочного клыка. DC_1 существенно ниже C_1, сильнее наклонен вперед и имеет лучше развитый задний выступ. Энтони полагал [9, с. 90], что на этой возрастной стадии функционировали молочные резцы.

С. Макдауэлл [10, с. 160] с помощью рентгенографии обнаружил у изученной Энтони молодой особи *N. edithae* эмалевый колпачок зачаточного второго резца (I_2) в глубине альвеолы DI_2, но не отметил каких-либо следов DI_1, DI_3 и молочных премоляров. Макдауэлл полагал, что столь скудная представленность молочных зубов в весьма обильных по числу особей материалах может быть связана с тем, что молочные зубы незофонтов выпадали очень рано в онтогенезе – еще до того, как зверьки начинали активно самостоятельно питаться на поверхности земли, становясь добычей хищных птиц и попадая в пещерные тафоценозы [10, с. 149]. Для молочных премоляров он рассматривал также альтернативную возможность – предполагал, что именно молочная смена функционировала в течение жизни животных, тогда как постоянная смена не проявлялась вовсе [10, с. 150, 160]. В итоге Макдауэлл предложил следующую последовательность прорезывания

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

нижних зубов у *Nesophontes*: -DI_2-DC_1----$M_1M_2M_3I_1I_2I_3C_1P_1P_2$-$P_4$ (при зубной формуле $I^{1-3}/_{1-3}C^1/_1P^{1-2,4}/_{1-2,4}M^{1-3}/_{1-3}$), и заключил, что наличие молочной смены зубов (по меньшей мере, DI_2 и DC_1) резко отличает незофонтид от землеройковых (Soricidae) [10, с. 160].

Б. Ржебик-Ковальская и Б. Волошин [4, с. 159, рис. 3H, табл. 4] отметили DC_1 у двух субфоссильных молодых экземпляров *N. major* (Куба, Хувентуд; минимальное число особей в выборке – 102). Они показали, что у этого вида DC_1 также отличается от C_1 меньшими размерами (включая высоту) и субпремоляриформным строением коронки.

Для исследования смены зубов у незофонтов необходимо изучение массовых материалов при целенаправленном внимании к остаткам наиболее молодых особей.

В настоящей статье приведены результаты исследования наиболее полных образцов *Nesophontes major* и *N. micrus* из верхнеплейстоценовых отложений пещеры Эль-Аброн в горах Сьерра-де-ла-Гуира (Sierra de La Güira), муниципалитет Лос-Паласиос (Los Palacios), провинция Пинардель-Рио Республики Куба (координаты 22°40' с.ш., 83°28' з.д.) [11]. В ноябре 2019 г. здесь проводила сборы ископаемых остатков Совместная российско-кубинская палеонтологическая экспедиция (СРКПЭ). Основной изученный материал происходит из слоя (уровня) VII (радиоуглеродная датировка 17406±161 лет, калиброванный возраст 20050–21474 лет; см. [11]), дополнительно изучены образцы из нижележащих слоев IX и VIII и вышележащих слоев VI и V.

Материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве. Фотографии сделаны с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega II XMU, рентгенографическое и томографическое исследование проведено на рентгеновском микротомографе SkyScan 1172 в ПИН. Измерения в мм.

Всего изучено более 40 черепных фрагментов и свыше 200 нижнечелюстных костей *N. major*, а также около 20 черепных фрагментов и более 100 нижнечелюстных костей *N. micrus*. Представлены экземпляры с C^1, P^1, P^2, P^4, M^1, M^2, M^3, I_1, I_2, I_3, C_1, P_1, DP_2, P_2, DP_4, P_4, M_1, M_2, M_3 (включая C^1, P^2, I_1, I_2, I_3, C_1, P_2, P_4 в состоянии прорезывания). В их числе экз. ПИН, №№ 5807/253, 254 из слоя VIII (глубина 2.35 м), экз. ПИН, № 5807/255 из слоя VII (глубина 1.5–1.54 м), экз. ПИН, №№ 5807/261–266 из слоя VII (глубина 1.2–1.5 м), экз. ПИН, № 5807/260 из слоя VII (глубина 1.25 м), экз. ПИН, №№ 5807/67, 71, 75, 77, 78, 267 из слоя VII (без указания глубины), экз. ПИН, №№ 5807/269–273 из слоя VI (без указания глубины), экз. ПИН, №№ 5807/275–277 из слоя V (глубина 0.45–0.5 м).

На фрагментарном черепе *Nesophontes major* (экз. ПИН, № 5807/269) впервые обнаружены свидетельства смены верхних зубов в локусах C^1, P^2 и P^4 (рис. 1). Левый C^1 и оба P^2 не прорезались из альвеол, их вершины лишь немного выступают за альвеолярный край верхнечелюстных костей. Основание и корни клыка не сформированы, межкорневой перегородки нет, коронка развернута в альвеоле (передняя сторона обращена лингвально) и наклонена вперед. Передняя и антеролингвальная бороздки C^1 (предположительно, служившие для стока яда, см. [12]) хорошо выражены. Альвеолы P^1 с межкорневой перегородкой без следов резорбции, что указывает на отсутствие смены зубов в этом локусе. P^2 одновершинный, вершина слегка загнута назад, корни короткие. Межкорневая перегородка альвеолы DP^2/P^2 резорбирована. Оба P^4 не сохранились, но их альвеолы широко раскрыты и не имеют межкорневых перегородок, что указывает на недавнюю (или неоконченную) смену зубов этого локуса. M^1 апикально стертые, с резкими, едва стертыми гребнями. Альвеолярная длина C^1–M^3 – 11.5 (левые), 11.3 (правые). Размеры M^1 (длина × × ширина): 2.4 × 2.9 (левый, правый).

Среди материалов по *N. major* представлены нижнечелюстные кости с I_3, C_1, P_2 и P_4 на разных стадиях прорезывания, а также фрагмент нижней челюсти молодой особи (экз. ПИН, № 5807/254) с несформированными краями альвеол M_1–M_3 (табл. 1).

Сохранившийся I_3 (экз. ПИН, № 5807/271; рис. 2а–2в) смещен из своей альвеолы в альвеолу DC_1/C_1 (из-за резорбции и частичного разрушения вентральной части межальвеолярной стенки DI_3/DC_1) и налегает сверху на клык C_1.

На наиболее ранней внутриальвеолярной стадии C_1 лежит в основании альвеолы DC_1 и не виден с боковых сторон зубной кости (экз. ПИН, №№ 5807/261, 271; рис. 2а–2в). Судя по рентгенографическим наблюдениям, минерализована лишь верхняя часть коронки этого зуба. На следующей стадии клык имеет сформированное основание коронки с задним выступом и короткий корень, вершина коронки слегка возвышается над альвеолярным краем зубной кости (экз. ПИН, №№ 5807/67, 270).

У большинства экземпляров с непрорезавшимися зубами (например, экз. ПИН, №№ 5807/262, 263; рис. 2г–2е) P_1 уже полностью функциональный (хотя и не стертый) и имеет альвеолу с полной (нерезорбированной) межкорневой перегородкой; лишь на экз. ПИН, № 5807/78 межкорневая перегородка неполная, что указывает либо на недавнее прорезывание P_1, либо на особенность его строения – сильно сближенные корни. Видимо, передние премоляры (P^1 и P_1) незофонтид не

Рис. 1. *Nesophontes major* Arredondo, 1970, экз. ПИН, № 5807/269, фрагмент черепа молодой особи, передняя часть с вентральной стороны; Куба, пещера Эль-Аброн (слой VI); верхний плейстоцен.

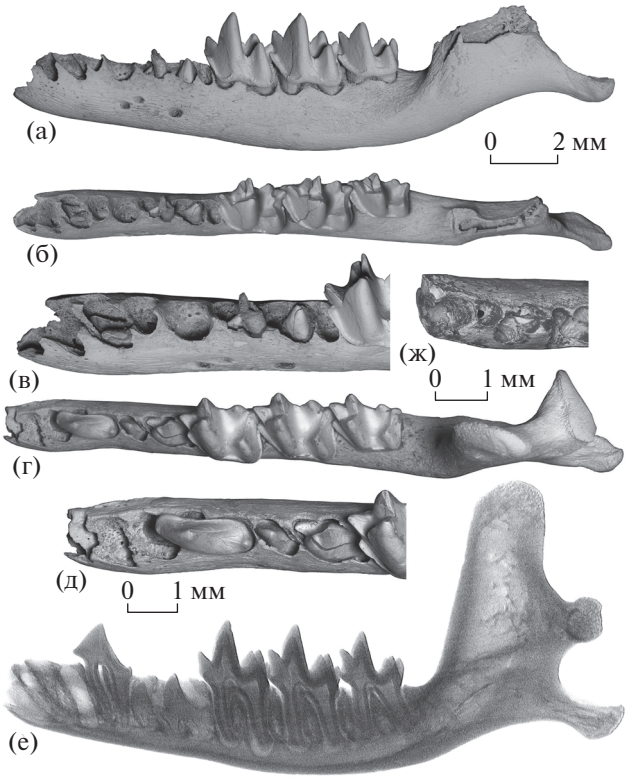

Рис. 2. *Nesophontes major* Arredondo, 1970: а–в – экз. ПИН, № 5807/271, левая нижнечелюстная кость с фрагментом DP_2, M_1–M_3 и непрорезавшимися I_3, C_1, P_2 и P_4: а – с лабиальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – передняя часть с окклюзиальной стороны с лингвальным наклоном; г–е – экз. ПИН, № 5807/262, левая нижнечелюстная кость с P_1, M_1–M_3 и непрорезавшимися P_2 и P_4 в альвеолах: г – с окклюзиальной стороны, д – передняя часть с окклюзиальной стороны, е – рентгенограмма с лабиальной стороны; ж – экз. ПИН, № 5807/71, передняя часть левой нижнечелюстной кости с непрорезавшимся P_4 с окклюзиальной стороны; Куба, пещера Эль-Аброн (а–в – слой VI; г–ж – слой VII); верхний плейстоцен.

имели смены (как у большинства плацентарных) и прорезывались в одно время с молярами.

На ранней стадии P_2 и P_4 были полностью скрыты в альвеолах, а функционировали DP_2 и DP_4. От DP_2 сохранился только короткий задний корень, под которым находится талонид скрытого в альвеоле P_2 (экз. ПИН, № 5807/271; рис. 2в). Альвеолы переднего и заднего корней молочных премоляров широко расставлены, а вентральнее DP_2 и DP_4 располагаются минерализованные коронки сменяющих зубов. На экз. ПИН, № 5807/71 в сломе стенки альвеолы утраченного DP_4 виден участок эмали находящегося внутри челюсти зуба, который еще не прорезался с окклюзиальной стороны (рис. 2ж). Рентгенографическое и томографическое изучение показало наличие в этой области крупной полости с коронкой P_4 в стадии формирования.

На стадии резорбции межкорневых перегородок и раскрытия альвеол P_2 и P_4 имеют полностью сформированные коронки с параконидом и талонидом и короткие корни (экз. ПИН, №№ 5807/78, 261, 262, 264, 271; рис. 2е). Широкое раскрытие и частичная резорбция краев и перегородок альвеол P_2 и P_4, свидетельствующие о незавершенном процессе прорезывания зубов этих локусов, фиксируется у ряда экземпляров с апикально стертыми молярами, у которых P_2–P_4 не сохранились (экз. ПИН, №№ 5807/67, 75, 77, 253, 270, 275).

На следующем этапе прорезывания P_4 приблизительно на треть высоты главного бугорка возвышается над альвеолярным краем зубной кости, тогда как P_2 полностью скрыт в альвеоле (экз. ПИН, № 5807/276). У P_4, прорезавшегося над альвеолярным краем зубной кости примерно на половину высоты главного бугорка, корни приблизительно вдвое уступают по длине корням моляров (экз. ПИН, № 5807/263).

Среди остатков *Nesophontes micrus* представлены нижнечелюстные кости с резцами (I_1, I_2, I_3), клыком (C_1) и премолярами (P_2, P_4) на разных стадиях прорезывания (табл. 2), а также один об-

Таблица 1. Размеры (в мм) нижней челюсти и зубов *Nesophontes major* Arredondo, 1970 из верхнего плейстоцена пещеры Эль-Аброн, Куба (обозначения: AL – альвеолярная длина; L – наибольшая длина; W – наибольшая ширина; D – высота горизонтальной ветви под M_2/M_3; HCP – высота венечного отростка; WAC – ширина суставного мыщелка)

Экземпляр ПИН, №	Длина зубных рядов и альвеол	Размеры зубов (L × W)	D	HCP	WAC
5807/67	L M_1–M_3: 6.6	M_1: 2.3 × 1.65; M_2: 2.3 × 1.7; M_3: 2.1 × 1.35	2.8	–	2.7
5807/71	AL M_1–M_3: 5.0	M_3: 2.0 × 1.4	2.6	–	2.6
5807/75	L M_1–M_3: 6.6	M_1: 2.4 × 1.6; M_2: 2.3 × 1.7; M_3: 2.2 × 1.45	2.7	6.4	2.6
5807/77	L M_1–M_3: 6.3	M_1: 2.2 × 1.55; M_2: 2.2 × 1.6; M_3: 2.0 × 1.35	2.7	–	2.5
5807/78	AL M_1–M_3: 6.0	M_3: 2.2 × 1.45	3.1	–	2.45
5807/253	L M_1–M_3: 5.9	M_1: 2.1 × 1.4; M_2: 2.1 × 1.5; M_3: 1.9 × 1.3	2.6	6.7	2.7
5807/254	AL M_1–M_3: 5.9	–	2.6	6.0	2.3
5807/261	AL M_1: 2.0	–	2.8	–	–
5807/262	L M_1–M_3: 6.7	P_1: 2.0 × 0.8; M_1: 2.4 × 1.55; M_2: 2.4 × 1.7; M_3: 2.1 × 1.45	2.8	6.5	2.7
5807/263	L M_1–M_3: 6.3	P_1: 2.0 × 0.8; M_1: 2.3 × 1.5; M_2: 2.3 × 1.6; M_3: 1.9 × 1.4	2.8	7.0	3.0
5807/264	AL M_1–M_3: 6.3	–	3.0	6.4	2.4
5807/270	L M_1–M_3: 6.4	M_1: 2.2 × 1.5; M_2: 2.2 × 1.6; M_3: 2.05 × 1.4	2.5	6.6	2.4
5807/271	L M_1–M_3: 6.0	M_1: 2.2 × 1.5; M_2: 2.3 × 1.55; M_3: 1.9 × 1.3	2.6	–	–
5807/275	L M_1–M_3: 6.15	P_1: 1.9 × 0.8; M_1: 2.2 × 1.5; M_2: 2.2 × 1.6; M_3: 1.95 × 1.4	2.6	6.3	–
5807/276	L M_1–M_3: 6.0	M_3: 1.9 × 1.4	2.6	6.2	2.5

Таблица 2. Размеры (в мм) нижней челюсти и зубов *Nesophontes micrus* Allen, 1917 из верхнего плейстоцена пещеры Эль-Аброн, Куба (обозначения см. табл. 1)

Экземпляр ПИН, №	Длина зубных рядов и альвеол	Размеры зубов (L × W)	D	HCP	WAC
5807/255	AL M_1: 1.7; AL M_2: 1.8	–	2.2	–	–
5807/260	L M_1–M_3: 6.0	DP_4: 1.6 × 0.75; M_1: 2.15 × 1.5; M_2: 2.05 × 1.5; M_3: 1.9 × 1.2	2.2	5.7	2.15
5807/265	AL M_1–M_3: 5.7	–	2.0	5.5	2.0
5807/266	AL M_1–M_3: 5.7	–	2.2	–	2.0
5807/267	L M_1–M_3: 5.9	M_1: 2.1 × 1.4; M_2: 2.0 × 1.45; M_3: 1.9 × 1.2	2.1	5.9	–
5807/272	L I_1–M_3: ~11.7; L M_1–M_3: 5.9	P_1: 1.6 × 0.6; M_1: 2.2 × 1.3; M_2: 2.1 × 1.4; M_3: 1.9 × 1.15	2.0	5.7	2.0
5807/273	L M_1–M_3: 5.9	M_1: 2.2 × 1.4; M_2: 2.1 × 1.45; M_3: 1.85 × 1.2	2.0	5.65	2.1
5807/277	AL M_1–M_3: 5.0; L M_2–M_3: 3.9	M_2: 2.2 × 1.4; M_3: 1.9 × 1.2	2.0	5.1	1.7

разец (экз. ПИН, № 5807/260) с DP_4 – это первая находка сохранившегося молочного предкоренного зуба у Nesophontidae, если не считать описанный выше фрагмент DP_2 *N. major*. DP_4 имеет широко расставленные корни (рис. 3а–3в) и характеризуется сравнительно низким и узким протоконидом и широким двухбугорковым талонидом (рис. 3б). Альвеолы P_2 и P_4 на начальной стадии раскрытия, над альвеолярным краем зубной кости возвышаются только вершины главных бугорков этих зубов, протоконид P_4 упирается в вентральную часть основания DP_4. Рентгенография показала наличие сформированных коротких корней у P_2 и P_4 (рис. 3в).

На экз. ПИН, № 5807/272 (рис. 3г–3е) в глубине альвеолы переднего резца (DI_1) видна сравнительно широкая коронка I_1 с несформированным корнем (рис. 3е). Зуб полностью находится внутри альвеолы и компактно в нее вмещается, впереди него имеется небольшое пространство для корня DI_1. На этой стадии вершина C_1 немного возвышается над альвеолярным краем зубной кости (экз. ПИН, №№ 5807/265, 272, 273), его коронка не вполне сформирована, корень отсут-

ствует. P_1 крупный, узкий, с коротким талонидом, без следов стирания (рис. 3г, 3д). Его корни полностью сформированные, длинные, передний существенно тоньше заднего. Вершина P_2 не выступает из альвеолы, над его коронкой сохранилась перемычка верхней части межкорневой перегородки альвеолы DP_2 (рис. 3д). Вершина P_4 едва возвышается над альвеолярным краем зубной кости, альвеолы корней DP_4 широко расставлены.

На экз. ПИН, № 5807/267 (рис. 3ж, 3з) I_1 слегка выступает из альвеолы, имеет широкую коронку шпателевидной формы и, судя по рентгенографии, сравнительно короткий корень. Межкорневая стенка альвеолы P_2 резорбирована. P_4 в стадии прорезывания почти на половину высоты коронки выступает над альвеолярным краем зубной кости.

У экз. ПИН, № 5807/255 двухлопастная коронка I_2 лежит в основании альвеол, причем ее передняя лопасть располагается под альвеолами DI_1 и DI_2, а задняя лопасть видна в сломе стенки альвеолы DI_3. Двухлопастная коронка I_3 в глубине альвеолы DI_3 сохранилась на экз. ПИН, № 5807/266.

На экз. ПИН, № 5807/277 P_2 в стадии прорезывания развернут в альвеоле передней стороной вверх; вершина P_4 едва выступает над альвеолярным краем зубной кости.

Суммируя приведенные данные, можно отобразить набор одновременно функционирующих и находящихся в процессе смены зубов у *Nesophontes* рядом последовательных состояний. Для краткости при их характеристике ниже использованы оригинальные формулы зубной смены (DRF, dental replacement formula), в которых буквой “e” (erupting) перед символом зуба (I, C, P) обозначены зубы в состоянии прорезывания, частично показавшиеся над альвеолой (после выпадения молочного предшественника), а буквой “a” (alveolar) обозначены зубы, полностью или почти полностью скрытые в альвеолах, при фактическом или реконструированном наличии молочного предшественника; отсутствующие из-за состояния сохранности зубы в формулах пропущены (знак “-”); полностью прорезавшиеся функциональные зубы не имеют специального знака перед символами; моляры опущены, поскольку не имеют смены.

Для верхних зубов *N. major* известны два состояния: $---eC^1P^1eP^2eP^4$ (экз. ПИН, № 5807/269) и $I^1I^2I^3C^1P^1P^2P^4$ (взрослые экземпляры). Для нижних зубных рядов фактически установлены следующие сочетания сменяющихся зубов: $--aI_3aC_1$-$DP_2aP_2aP_4$ (экз. ПИН, № 5807/271), $---aC_1$-aP_2aP_4 (экз. ПИН, № 5807/261), $----P_1aP_2aP_4$ (экз. ПИН, № 5807/262), $-----aP_2aP_4$ (экз. ПИН, № 5807/78), $------DP_4aP_4$ (экз. ПИН, № 5807/71), $----P_1$-eP_4 (экз. ПИН, № 5807/263), $-----aP_2eP_4$ (экз. ПИН, № 5807/276). Объединение этих данных позволяет реконструировать следующую последовательность состояний DRF: $--aI_3aC_1P_1DP_2aP_2DP_4aP_4 \rightarrow ---eC_1P_1aP_2eP_4 \rightarrow I_1I_2I_3C_1P_1P_2P_4$ (у взрослых экземпляров).

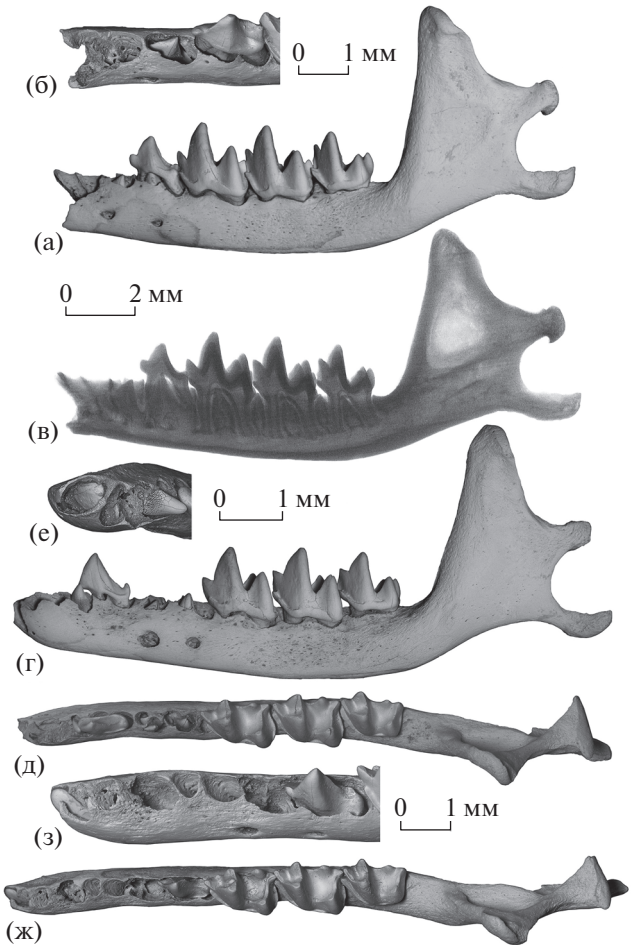

Рис. 3. *Nesophontes micrus* Allen, 1917: а–в – экз. ПИН, № 5807/260, левая нижнечелюстная кость с DP_4–M_3 и непрорезавшимися P_2 и P_4: а – с лабиальной стороны, б – передняя часть с окклюзиальной стороны, в – рентгенограмма с лабиальной стороны; г–е – экз. ПИН, № 5807/272, левая нижнечелюстная кость с P_1 и M_1–M_3, с непрорезавшимися I_1, C_1, P_2 и P_4: г – с лабиальной стороны, д – с окклюзиальной стороны, е – передняя часть с передней стороны; ж, з – экз. ПИН, № 5807/267, левая нижнечелюстная кость с M_1–M_3 и полупрорезавшимися I_1 и P_4: ж – с окклюзиальной стороны, з – передняя часть с окклюзиальной стороны с лингвальным наклоном; Куба, пещера Эль-Аброн (а–в, ж, з – слой VII; г–е – слой VI); верхний плейстоцен.

Для нижних зубных рядов *N. micrus* фактически установлены следующие сочетания зубов: aI_1--$aC_1P_1aP_2aP_4$ (экз. ПИН, № 5807/272), -aI_2-aC_1--- (экз. ПИН, № 5807/255), $--aI_3$--aP_2aP_4 (экз. ПИН,

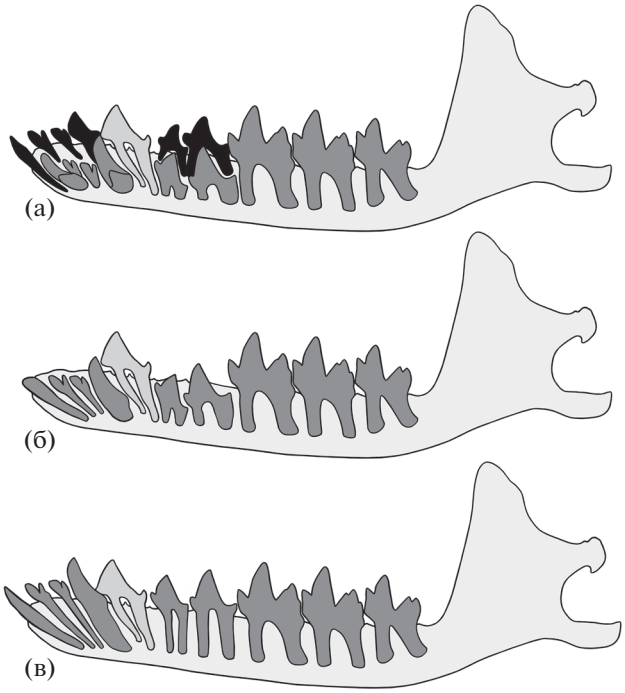

Рис. 4. Схема основных стадий смены нижних зубов у *Nesophontes* (полный левый зубной ряд с лабиальной стороны): а – стадия молочных зубов и моляров ($DI_1aI_1DI_2aI_2DI_3aI_3DC_1aC_1P_1DP_2aP_2DP_4aP_4M_1M_2M_3$); б – стадия прорезывания передних зубов ($eI_1eI_2eI_3eC_1P_1eP_2eP_4M_1M_2M_3$); в – взрослая стадия ($I_1I_2I_3C_1P_1P_2P_4M_1M_2M_3$). Черным цветом обозначены молочные зубы, темно-серым – постоянные зубы, светло-серым – передний премоляр с одной установленной сменой.

№ 5807/266), -----$aP_2DP_4aP_4$ (экз. ПИН, № 5807/260), -----aP_2aP_4 (экз. ПИН, № 5807/277), eI_1-----eP_4 (экз. ПИН, № 5807/267). Синтез этих данных позволяет реконструировать следующую последовательность состояний DRF: $aI_1aI_2aI_3aC_1P_1DP_2aP_2DP_4aP_4 \rightarrow eI_1$-----$eP_4 \rightarrow I_1I_2I_3C_1P_1P_2P_4$.

В итоге для изученных видов *Nesophontes* можно реконструировать следующую последовательность основных стадий прорезывания и смены нижних зубов и состояний DRF (с учетом моляров): $DI_1aI_1DI_2aI_2DI_3aI_3DC_1aC_1P_1DP_2aP_2DP_4aP_4M_1M_2M_3$ (рис. 4а) $\rightarrow eI_1eI_2eI_3eC_1P_1eP_2eP_4M_1M_2M_3$ (рис. 4б) $\rightarrow I_1I_2I_3C_1P_1P_2P_4M_1M_2M_3$ (рис. 4в). Предполагаемая последовательность прорезывания клыка и премоляров – P_1, C_1, P_4, P_2.

Судя по изученным материалам, после завершения смены зубов рост животных продолжался. Последующие изменения в строении передней части зубного аппарата незофонтов, включающие формирование заметных межзубных промежутков в ряду премоляров, были связаны с удлинением челюстей.

Итак, у незофонтид в молочной зубной смене представлены резцы, клыки и премоляры. В онтогенезе смена всех этих зубов (кроме P_1) происходила после прорезывания моляров, но до достижения животным взрослых размеров. Таким образом, по характеру процесса зубной смены незофонтиды существенно отличаются от большинства представителей Lipotyphla и сближаются с Solenodontidae [см. 10, 13, 14].

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит доктора Ф.М. Гонсалеса Бермудеса и К.А. Мендеса Гарсия (Министерство науки, технологии и окружающей среды Республики Куба, CITMA) за организационную помощь и дружескую поддержку, Э. Перес Лоренсо (Национальный музей естественной истории Кубы), Н.В. Зеленкова, А.К. Агаджаняна (ПИН) и всех сотрудников СРКПЭ – за участие в экспедиции 2019 г., А.В. Пахневича и Р.А. Ракитова (ПИН) – за техническую помощь в проведении томографии и подготовке фотографий на СЭМ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках работ Совместной российско-кубинской палеонтологической экспедиции при частичной поддержке гранта РФФИ и CITMA № 18-54-34004 “Позднечетвертичные позвоночные Кубы: реликтовые фауны на пороге голоценового вымирания”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *MacPhee R.D.E., Flemming C., Lunde D.P.* “Last occurrence” of the Antillean insectivoran *Nesophontes*: new radiometric dates and their interpretation // American Museum Novitates. 1999. № 3261. P. 1–20.
2. *Orihuela J., Vinola L.W., Jiménez Vásquez O., et al.* Assessing the role of humans in Greater Antillean land vertebrate extinctions: new insights from Cuba // Quaternary Science Reviews. 2020. V. 249: 106597.
3. *Condis Fernández M.M., Jiménez Vásquez O., Arredondo C.* Revisión taxonómica del género *Nesophontes* (Insectivora: Nesophontidae) en Cuba: análisis de los caracteres diagnóstico // Monografies de la Societat d’Història Natural de les Balears. 2005. № 12. P. 95–100.
4. *Rzebik-Kowalska B., Wołoszyn B.W.* New data on *Nesophontes* subfossil populations from Cuba and Isla de la Juventud (Cuba) // Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Abhandlungen. 2012. V. 263. № 2. P. 155–166.
5. *Morgan G.S., MacPhee R.D.E., Woods R., Turvey S.T.* Late Quaternary fossil mammals from the Cayman Islands, West Indies // Bulletin of the American Museum of Natural History. 2019. № 428. P. 1–79.

6. *Buckley M., Harvey V.L., Orihuela J., et al.* Collagen sequence analysis reveals evolutionary history of extinct West Indies *Nesophontes* (island-shrews) // Molecular Biology and Evolution. 2020. V. 37. № 10. P. 2931–2943.

7. *Woods R., Turvey S.T., Brace S., et al.* Rapid size change associated with intra-island evolutionary radiation in extinct Caribbean "island-shrews" // BMC Evolutionary Biology. 2020. V. 20. № 106. P. 1–12.

8. *Silva Taboada G., Suárez Duque W., Díaz Franco S.* Compendio de los mamíferos terrestres autóctonos de Cuba vivientes y extinguidos. La Habana: Museo Nacional de Historia Natural, 2007.

9. *Anthony H.E.* Mammals of Porto Rico, living and extinct. Chiroptera and Insectivora. In: *Scientific Survey of Porto Rico and the Virgin Islands.* New York: New York Acad., 1927. V. 9, Pt. 1. P. 140–149.

10. *McDowell S.B.* The Greater Antillean insectivores // Bulletin of the American Museum of Natural History. 1958. № 115. P. 113–214.

11. *Suárez W., Díaz-Franco S.* A new fossil bat (Chiroptera: Phyllostomidae) from a Quaternary cave deposit in Cuba // Caribbean Journal of Science. 2003. V. 39. № 3. P. 371–377.

12. *Turvey S.T.* Evolution of non-homologous venom delivery systems in West Indian insectivores? // Journal of Vertebrate Paleontology. 2010. V. 30. № 4. P. 1294–1299.

13. *Orihuela J.* Endocranial morphology of the extinct Antillean shrew *Nesophontes* (Lipotyphla: Nesophontidae) from natural and digital endocasts of Cuban taxa // Palaeontologia Electronica. 2014. V. 17. № 2. P. 1–21.

14. *Brace S., Thomas J.A., Dalén L., et al.* Evolutionary history of the Nesophontidae, the last unplaced Recent mammal family // Molecular Biology and Evolution. 2016. V. 33. № 12. P. 3095–3103.

DENTAL REPLACEMENT IN NESOPHONTIDAE (LIPOTYPHLA, MAMMALIA) FROM THE PLEISTOCENE OF CUBA

Academician of the RAS A. V. Lopatin[#]

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

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

The presence of deciduous premolars and erupting C^1, P^2, P^4, I_1, I_2, I_3, P_2 and P_4 in Nesophontidae is established for the first time on the remains of *Nesophontes major* Arredondo, 1970, and *N. micrus* Allen, 1917 from El Abrón Cave (Republic of Cuba, Pinar del Río Province, Late Pleistocene). During ontogenesis, the replacement of teeth (except P^1 and P_1) occurred after the molar eruption, but before the animal reached adult size. By the dental replacement pattern nesophontids differ from most members of Lipotyphla and are close to Solenodontidae.

Keywords: Nesophontes, Nesophontidae, deciduous premolars, dental replacement, Late Pleistocene, Cuba

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 125–130

УДК 569.33:551.793(729.1)

АНОМАЛИИ ЗУБНОЙ СИСТЕМЫ У NESOPHONTIDAE (LIPOTYPHLA, MAMMALIA) ИЗ ПЛЕЙСТОЦЕНА КУБЫ

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин*

Поступило 01.12.2020 г.
После доработки 10.12.2020 г.
Принято к публикации 10.12.2020 г.

Изучение остатков *Nesophontes micrus* Allen, 1917 и *N. major* Arredondo, 1970 из пещеры Эль-Аброн (Республика Куба, провинция Пинар-дель-Рио, поздний плейстоцен) позволило впервые отметить аномалии зубной системы Nesophontidae. Нарушения прорезывания зубов (импакция I_3 у *N. micrus*, ретенция или импакция P_2 у *N. major*), как и мальформации (аберрантные I_3 у *N. micrus*, P_2 и P_4 у *N. major*), являются аномалиями развития. Отсутствие у *N. major* P_2 и M_2 при реоссификации их альвеол обусловлено травмами и заболеваниями зубов.

Ключевые слова: Nesophontes, Nesophontidae, поздний плейстоцен, Куба, зубная система, аномалии развития, мальформации, нарушения прорезывания, травмы и заболевания зубов, палеопатология

DOI: 10.31857/S2686738921020190

Из плейстоцена и голоцена Кубы известны ископаемые и субфоссильные остатки двух видов насекомоядных вымершего эндемичного семейства Nesophontidae – более мелкого *Nesophontes micrus* Allen, 1917 и более крупного *N. major* Arredondo, 1970 [1, 2]. Таксономическая самостоятельность этих видов согласуется с результатами протеомного анализа [3].

Оба кубинских вида незофонтов известны по многочисленным экземплярам из ряда местонахождений [4]. Массовые материалы делают возможным изучение внутривидовой изменчивости морфологических признаков, включая различные отклонения. Из верхнеплейстоценовых отложений пещеры Эль-Аброн (провинция Пинар-дель-Рио, координаты 22°40' с.ш., 83°28' з.д.) в 2019 г. Совместной российско-кубинской палеонтологической экспедицией (СРКПЭ) были добыты около 20 черепных фрагментов и 100 нижнечелюстных костей *N. micrus* и более 40 черепных фрагментов и 200 нижнечелюстных костей *N. major*. Изученные материалы происходят из слоя VII с радиоуглеродной датировкой 17406 ± 161 лет (калиброванный возраст 20050–21474 лет) [5], а также из нижележащих слоев IX и VIII и вышележащих слоев VI и V. В результате изучения изменчивости морфологии среди них обнаружены несколько экземпляров нижнечелюстных костей с аномалиями зубной системы: *N. major*, экз. ПИН, № 5807/251 из слоя IX (глубина 2.93 м) и экз. ПИН, №№ 5807/66, 68, 76 из слоя VII (без указания глубины); *N. micrus*, экз. ПИН, № 5807/173 из слоя VII (без указания глубины).

При исследовании выявленных аномалий зубной системы учитывались новейшие данные о смене зубов у Nesophontidae, включая сведения о смене всех нижних резцов, клыка и премоляров P_2 и P_4 при зубной формуле $I_{1-3}C_1P_{1-2,4}M_{1-3}$ [6].

Изученный материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве. Фотографии сделаны с помощью сканирующего электронного микроскопа Tescan Vega II XMU, рентгенографическое и томографическое исследование проведено на рентгеновском микротомографе SkyScan 1172 в ПИН.

На нижнечелюстной кости *Nesophontes micrus* (экз. ПИН, № 5807/173) перед обломанным клыком C_1 имеется полуоткрытая альвеола с непрорезавшимся последним резцом I_3 (рис. 1). Резец заметно скошен, его альвеола ориентирована дорсолабиально. Отверстие альвеолы овальной формы, смещено на лабиальную сторону и расположено заметно вентральнее альвеолярного края горизонтальной ветви. На рентгенограмме видно, что в этой альвеоле находится аномально мелкий нефункциональный зуб с редуцированной коронкой, узкой пульпарной полостью и нормальным корневым каналом, сообщающимся с нижнечелюстным каналом (рис. 1д). На слегка выступающей из альвеолы части коронки зуба повреждений не отмечено. Очевидно, при жизни

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

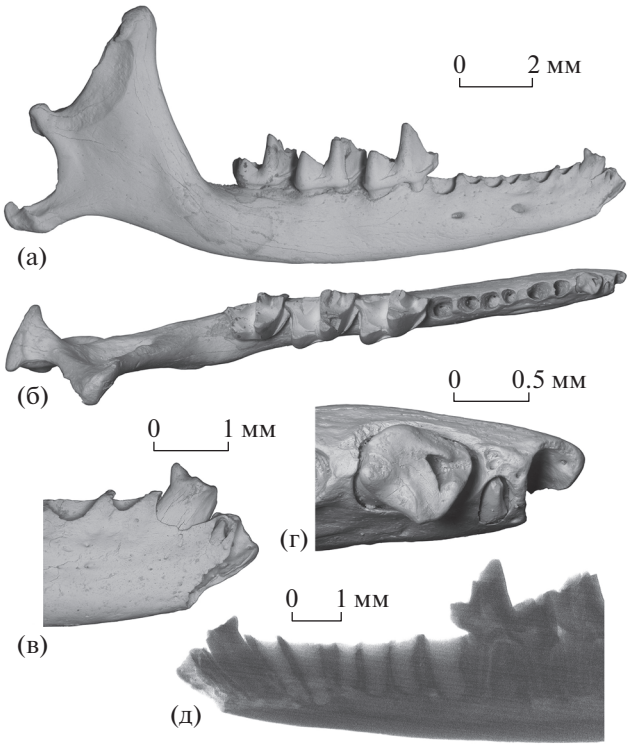

Рис. 1. *Nesophontes micrus* Allen, 1917, экз. ПИН, № 5807/173, правая нижнечелюстная кость с I_3–C_1 и M_1–M_3: а – с лабиальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – передняя часть с лабиальной стороны, г – передняя часть с окклюзиальной стороны, д – рентгенограмма передней части с лингвальной стороны; Куба, пещера Эль-Аброн (слой VII); верхний плейстоцен.

животного I_3 был полностью скрыт десной. Непосредственно перед клыком поверхность кости покрыта мелкими неровностями и углублениями, видимо, связанными с регенерацией костной ткани. Эта часть кости нависает над вершиной резца с лингвальной стороны. Скорее всего, данное состояние связано с отклонением развития (мальформацией) и нарушением прорезывания постоянного резца I_3 при частичной наружной облитерации альвеолы молочного резца DI_3.

Патологическое нарушение (задержка и остановка) процесса прорезывания зубов называется ретенцией. Нарушение рассматривается как импакция, если оно обусловлено наличием препятствия для непрорезавшегося зуба в виде другого зуба или нерезорбированной костной ткани [7]. В описанном случае импакция I_3 могла быть связана с ранней потерей его молочного предшественника (DI_3) в результате травмы или заболевания и последующим сближением соседних зубов (DI_2 и DC_1) друг с другом [см. 7, с. 348] при частичном зарастании отверстия альвеолы DI_3. Это смещение сильно сократило межзубной промежуток на месте выпавшего DI_3 и воспрепятствовало нормальному формированию и прорезыванию I_3 [см. 6].

Судя по слабо стертым молярам с узкими фасетками стирания на гребнях, данная нижнечелюстная кость принадлежала взрослой особи сравнительно молодого возраста. Размеры экз. ПИН, № 5807/173 (в мм): длина M_1–M_3 – 5.9; моляры (длина × ширина): M_1 – 2.1 × 1.4; M_2 – 2.1 × 1.4; M_3 – 1.9 × 1.2; высота горизонтальной ветви нижней челюсти под M_2/M_3 – 2.2; высота венечного отростка – 5.5; ширина суставного мыщелка – 2.2.

Нижнечелюстная кость *Nesophontes major*, экз. ПИН, № 5807/76, несет аномально мелкий предпоследний премоляр P_2 (рис. 2). Его корни короткие, а коронка очень маленькая, слабо удлиненная и не полностью выступает над альвеолярным краем горизонтальной ветви. На задней и лингвальной сторонах P_2 хорошо выражен цингулид. Костные края альвеолы немного нависают над цингулидом P_2, это хорошо заметно с окклюзиальной и лингвальной сторон горизонтальной ветви (рис. 2б, 2д). Альвеолы корней последнего премоляра P_4 крупные. Вероятно, описанное состояние P_2 представляет собой аномалию развития (мальформацию), связанную с задержкой прорезывания (либо ретенцией неясной природы, либо импакцией из-за приближенных к P_2 соседних крупных премоляров, P_1 и P_4) [см. 7, рис. 11.55]. Нижнечелюстная кость принадлежала полностью взрослой или сенильной (стареющей) особи, так как сохранившиеся моляры (M_1 и M_2) довольно сильно стерты, фасетки стирания гребней на них широкие, слитые между собой. Размеры нижней челюсти и зубов *N. major* приведены в табл. 1.

По длине P_2 (около 0.8 мм, эмаль в передней части разрушена) экз. ПИН, № 5807/76 сильно уступает другим экземплярам *N. major* (длина 1.23–1.8 мм, в среднем 1.5 мм, $n = 26$) [2]. Наличие аномально мелких премоляров отмечено у современных кротовых [8, рис. 9].

Нижнечелюстная кость *N. major*, экз. ПИН, № 5807/66, содержит целые P_4–M_3 и альвеолы I_1–P_2 (рис. 3). Моляры слабо стертые, фасетки стирания гребней узкие. Зуб в локусе последнего премоляра имеет аберрантное строение, которое заметно отличается от типичного для P_4 *N. major* (см. рис. 4). Он характеризуется тесно прижатыми друг к другу корнями, высоким и коротким протоконидом с вертикальной задней стенкой, маленьким параконидом и очень коротким и низким талонидом. От M_1 этот зуб отделен заметным промежутком, что также нехарактерно для *N. major* (см. рис. 4). Рентгенографическое и томографическое изучение образца позволило выявить длинные корни P_4 и отсутствие сменяющих зубов

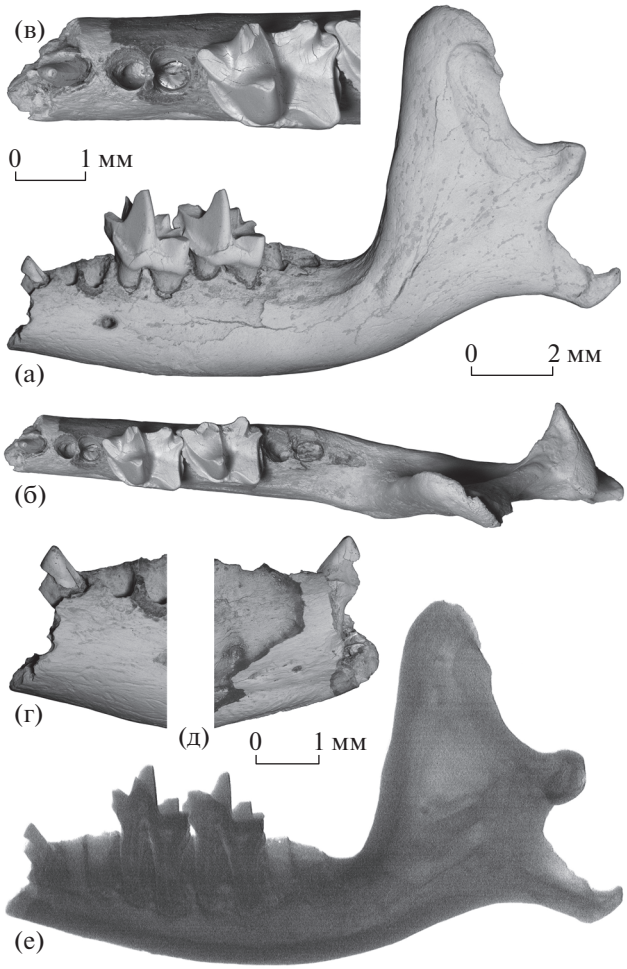

Рис. 2. *Nesophontes major* Arredondo, 1970, экз. ПИН, № 5807/76, левая нижнечелюстная кость с P_2 и M_1–M_2: а – с лабиальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – передняя часть с окклюзиальной стороны, г – передняя часть с лабиальной стороны, д – передняя часть с лингвальной стороны, е – рентгенограмма с лабиальной стороны; Куба, пещера Эль-Аброн (слой VII); верхний плейстоцен.

в альвеолах локусов I_1–P_4 (рис. 3в). Таким образом, описываемый зуб – это постоянный последний премоляр [см. 6], демонстрирующий отклонение в строении коронки (мальформацию). Альвеолярный край кости непосредственно перед M_1 резорбирован, что может указывать на наличие патологического процесса, с которым допустимо связать мальформацию P_4.

На нижнечелюстных костях двух других особей *N. major* (рис. 4) имеются свидетельства прижизненной утраты щечных зубов и наружного зарастания их альвеол. В одном случае утрачен P_2 (экз. ПИН, № 5807/251), в другом – M_2 (экз. ПИН, № 5807/68).

Экз. ПИН, № 5807/251 с умеренно стертыми молярами обнаруживает аномальное отсутствие предпоследнего премоляра P_2 (рис. 4а, 4б). В промежутке между P_1 и P_4 хорошо заметны две крохотные поверхностные ямки на месте альвеол корней утраченного P_2. Альвеолярный край в области межзубного промежутка немного прогнут. Рентгенографическое исследование позволило установить, что альвеолы изолированы от нижнечелюстного канала и заполнены пористой костной тканью (рис. 4в). Это свидетельствует о полном зарастании альвеол после выпадения P_2 [см. 9, 10]. Соответственно, причиной отсутствия зуба в данном случае является травма или заболевание, а не генетически обусловленный дефект развития, приводящий к гиподонтии (олигодонтии). Заболевания и залеченные травмы нижней челюсти, сопровождающиеся утратой премоляров и моляров, описаны у современных землероек [11].

Экз. ПИН, № 5807/68 демонстрирует аномальное отсутствие предпоследнего моляра и патологическое деградированное состояние зубной ветви в области M_2 (рис. 4г–4е) – сильный прогиб ее альвеолярной стороны [см. 7, рис. 24.50; 12,

Таблица 1. Размеры (в мм) нижней челюсти и зубов *Nesophontes major* Arredondo, 1970 из верхнего плейстоцена пещеры Эль-Аброн, Куба (обозначения: AL – альвеолярная длина; L – наибольшая длина; W – наибольшая ширина; D – высота горизонтальной ветви под M_2/M_3; HCP – высота венечного отростка; WAC – ширина суставного мыщелка)

Экземпляр ПИН, №	Длина зубных рядов и альвеол	Размеры зубов (L × W)	D	HCP	WAC
5807/66	L M_1–M_3: 6.4	P_4: 1.3 × 0.85; M_1: 2.3 × 1.65; M_2: 2.3 × 1.7; M_3: 2.1 × 1.35	2.7	6.2	2.8
5807/68	–	P_4: 1.6 × 0.9	2.8	6.4	2.7
5807/76	AL M_1–M_3: 5.7	P_2: ~ 0.8 × 0.6; M_1: 2.2 × 1.7; M_2: 2.3 × 1.8	3.0	7.2	2.8
5807/251	L P_4–M_3 – 7.3; L M_1–M_3 – 5.9	P_1: 2.1 × 0.95; P_4: 1.6 × 1.0; M_1: 2.2 × 1.7; M_2: 2.1 × 1.7; M_3: 1.9 × 1.5	2.8	–	–

рис. 1, J]. В локусе M_2 между альвеолами M_1 и M_3 отсутствуют отверстия альвеол для корней зуба, а на их месте в пределах прогнутой части челюсти находится продольно вытянутое углубление с многочисленными мелкими ямками и порами. Рентгенографическое исследование (рис. 4ж) показало наличие внутри кости заросших альвеол, заполненных пористой костной тканью и капсулированных как с наружной стороны, так и со стороны нижнечелюстного канала. Можно заключить, что видимое отсутствие альвеол M_2 на экз. ПИН, № 5807/68 обусловлено их реоссификацией и наружной облитерацией после прижизненной утраты разрушенного или больного зуба [см. 13, 14]. Деградация костной ткани с сильным уменьшением высоты зубной ветви указывает на осложненный периодонтит как причину утраты зуба [7].

Таким образом, исследование массовых остатков *Nesophontes micrus* и *N. major* из пещеры Эль-Аброн позволило впервые выявить аномалии зубной системы Nesophontidae, включая нарушения прорезывания и отклонения в развитии резцов и премоляров, а также связанное с травмами и заболеваниями патологическое отсутствие премоляров и моляров при реоссификации их альвеол.

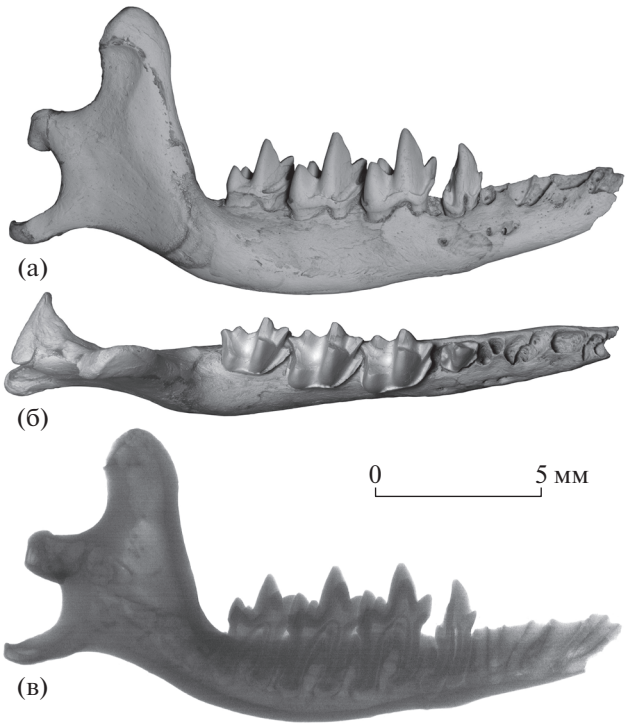

Рис. 3. *Nesophontes major* Arredondo, 1970, экз. ПИН, № 5807/66, правая нижнечелюстная кость с P_4–M_3: а – с лабиальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – рентгенограмма с лабиальной стороны; Куба, пещера Эль-Аброн (слой VII); верхний плейстоцен.

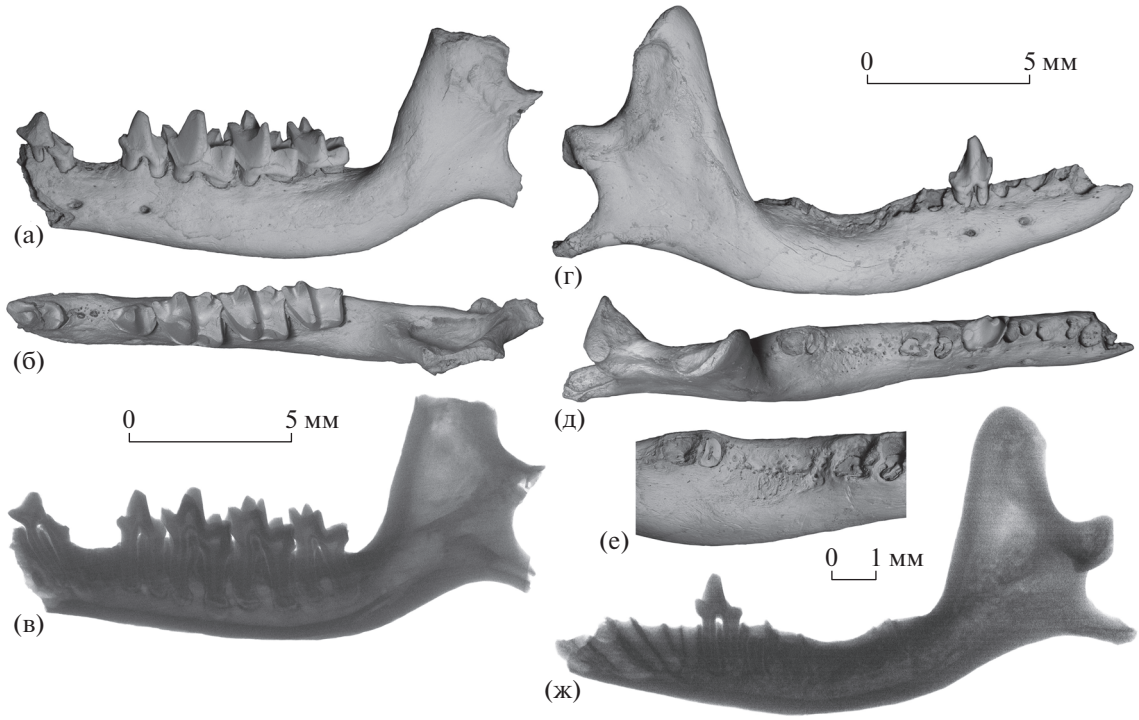

Рис. 4. *Nesophontes major* Arredondo, 1970: а–в – экз. ПИН, № 5807/251, левая нижнечелюстная кость с P_1, P_4–M_3 и заросшими альвеолами P_2: а – с лабиальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – рентгенограмма с лабиальной стороны; г–ж – экз. ПИН, № 5807/68, правая нижнечелюстная кость с P_4, альвеолами C_1–P_2, корнями M_1, M_3 и заросшими альвеолами M_2: г – с лабиальной стороны, д – с окклюзиальной стороны, е – область моляров с окклюзиальной стороны с лингвальным наклоном, ж – рентгенограмма с лингвальной стороны; Куба, пещера Эль-Аброн (а–в – слой IX; г–ж – слой VII); верхний плейстоцен.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит доктора Ф.М. Гонсалеса Бермудеса и К.А. Мендеса Гарсия (Министерство науки, технологии и окружающей среды Республики Куба, CITMA) за организационную помощь и дружескую поддержку, Э. Перес Лоренсо (Национальный музей естественной истории Кубы), Н.В. Зеленкова, А.К. Агаджаняна (ПИН) и всех сотрудников СРКПЭ – за участие в экспедиции 2019 г., А.В. Пахневича и Р.А. Ракитова (ПИН) – за техническую помощь в проведении томографии и подготовке фотографий на СЭМ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено в рамках работ Совместной российско-кубинской палеонтологической экспедиции при частичной поддержке гранта РФФИ и CITMA № 18-54-34004 “Позднечетвертичные позвоночные Кубы: реликтовые фауны на пороге голоценового вымирания”

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Condis Fernández M.M., Jiménez Vásquez O., Arredondo C.* Revisión taxonómica del género *Nesophontes* (Insectivora: Nesophontidae) en Cuba: análisis de los caracteres diagnóstico // Monografies de la Societat d’Història Natural de les Balears. 2005. № 12. P. 95–100.
2. *Rzebik-Kowalska B., Wołoszyn B.W.* New data on *Nesophontes* subfossil populations from Cuba and Isla de la Juventud (Cuba) // Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Abhandlungen. 2012. V. 263. № 2. P. 155–166.
3. *Buckley M., Harvey V.L., Orihuela J., et al.* Collagen sequence analysis reveals evolutionary history of extinct West Indies *Nesophontes* (island-shrews) // Molecular Biology and Evolution. 2020. V. 37. № 10. P. 2931–2943.
4. *Silva Taboada G., Suárez Duque W., Díaz Franco S.* Compendio de los mamíferos terrestres autóctonos de Cuba vivientes y extinguidos. La Habana: Museo Nacional de Historia Natural, 2007.
5. *Suárez W., Díaz-Franco S.* A new fossil bat (Chiroptera: Phyllostomidae) from a Quaternary cave deposit in Cuba // Caribbean Journal of Science. 2003. V. 39. № 3. P. 371–377.
6. *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.
7. *Miles A.E.W., Grigson C.* Colyer’s variations and diseases of the teeth of animals. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.

8. *Asahara M., Kryukov A., Motokawa M.* Dental anomalies in the Japanese mole *Mogera wogura* from northeast China and the Primorsky region of Russia // Acta Theriologica. 2012. V. 57. № 1. P. 41–48.

9. *Wilson R.W.* Two cases of dental anomaly in early Tertiary mammals // Transactions of the Kansas Academy of Science. 1955. V. 58. № 4. P. 514–518.

10. *Лопатин А.В.* Древнейший *Hapalodectes* (Mesonychia, Mammalia) из палеоцена Монголии // Палеонтологический журнал. 2001. № 4. С. 90–96.

11. *Jentzsch M., Kraft R., Lemkul A., et al.* Anomalies and pathological changes of skulls and dentition of wild small mammal species from Germany // Journal of Vertebrate Biology. 2020. V. 69. № 4. P. 1–19.

12. *Powers P.M., Mead A.J.* Dental and mandibular anomalies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Central Georgia // Georgia Journal of Science. 2019. V. 77. № 2. Art. 15. P. 1–11.

13. *Vilà C., Urios V., Castroviejo J.* Tooth losses and anomalies in the wolf (*Canis lupus*) // Canadian Journal of Zoology. 1993. V. 71. № 5. P. 968–971.

14. *Palmqvist P., Arribas A., Martínez-Navarro B.* Ecomorphological study of large canids from the Lower Pleistocene of southeastern Spain // Lethaia. 1999. V. 32. № 1. P. 75–88.

DENTITION ANOMALIES IN NESOPHONTIDAE (LIPOTYPHLA, MAMMALIA) FROM THE PLEISTOCENE OF CUBA

Academician of the RAS A. V. Lopatin[#]

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

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

The study of the remains of *Nesophontes micrus* Allen, 1917 and *N. major* Arredondo, 1970 from El Abrón Cave (Republic of Cuba, Pinar del Río Province, Late Pleistocene) allowed to establish for the first time anomalies of the dentition in Nesophontidae. Failures of eruption of teeth (impaction of I_3 in *N. micrus*, retention or impaction of P_2 in *N. major*), as well as malformations (aberrant I_3 in *N. micrus*, P_2 and P_4 in *N. major*), are the developmental abnormalities. The absence of P_2 and M_2 in combination with reossification of their alveoli in *N. major* is caused by dental injuries and diseases.

Keywords: Nesophontes, Nesophontidae, Late Pleistocene, Cuba, dentition, development anomalies, malformations, eruption failures, dental injuries and diseases, paleopathology

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 131–134

УДК 504.064.36:574

ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ОЛОВА В БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *SACCHARINA LATISSIMA* БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2021 г. Л. О. Метелькова[1], З. А. Жаковская[1], Г. И. Кухарева[1], Г. М. Воскобойников [2,*], академик РАН Г. Г. Матишов[2]

Поступило 03.10.2020 г.
После доработки 21.10.2020 г.
Принято к публикации 23.10.2020 г.

Проведена оценка степени загрязнения оловоорганическими соединениями – монобутилоловом, дибутилоловом, трибутилоловом, тетрабутилоловом, трифенилоловом и трициклогексилоловом *Saccharina latissima,* доминирующей среди водорослей-макрофитов, из сублиторали Кольского залива и Восточного Мурмана Баренцева моря. Полученные результаты показали умеренное загрязнение исследованных образцов оловоорганическими соединениями. Суммарное содержание шести соединений олова находилось в диапазоне 17–74 нг/г (сухого веса) в пробах водорослей. Анализ индексов деградации бутил-производных олова указал на активно протекающие процессы трансформации трибутилолова и тетрабутилолова в водорослях.

Ключевые слова: Баренцево море, *Saccharina latissima*, оловоорганические соединения
DOI: 10.31857/S2686738921020207

ВВЕДЕНИЕ

Оловоорганические соединения (ООС) являются востребованными в современной промышленности продуктами и находят широкое применение во всем мире в качестве стабилизаторов поливинилхлорида, в производстве полиуретанов, силикона, красок и пестицидов [1–3]. Особое распространение получили соединения трибутилолова (ТБО) как биоцидные компоненты противообрастательных (antifouling) красок в судостроении [4]. Использование таких красок приводит к поступлению значительного количества биоцидов в гидробионты. Воздействуя на живые морские организмы, ООС разрушают, в основном, эндокринную и иммунную системы. Все известные ООС обладают как острой, так и хронической токсичностью, однако наибольший вред гидробионтам оказывают соединения трибутилолова (ТБО) и трифенилолова (ТФО) [5–7]. В литературе отсутствуют сведения о степени загрязнения ООС водорослей-макрофитов, являющимися средообразующими организмами литорали и сублиторали большинства морей. Цель настоящей работы состояла в определении присутствия и оценке степени загрязнения ООС *Saccharina latissima*, вида водорослей, доминирующих в сублиторали северных морей. Полученные данные будут способствовать пониманию механизмов накопления, преобразования ООС в тканях сахарины. Необходимо отметить, что помимо академического данные сведения имеют и чисто практический интерес: заросли *S. latissima* являются местом обитания и размножения многих гидробионтов, исследуемый вид широко используется в пищевой, медицинской промышленности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы бурой водоросли *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) отбирались осенью 2019 г. на побережье Кольского залива и Восточного Мурмана (Баренцево море) с глубины 9 м (табл. 1), высушивались при комнатной температуре, гомогенизировались и направлялись на анализ. Аналитическая процедура определения массовой доли ООС в водорослях была разработана на основе методики ISO количественного определения производных (дериватов) ООС в воде методом ГХ/МС [8]. В качестве внутреннего стандарта и

[1] *Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр Российской академии наук» (НИЦЭБ РАН – СПб ФИЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия*
[2] *ФГБУН Мурманский морской биологический институт РАН (ММБИ РАН), Мурманск, Россия*
**e-mail: grvosk@mail.ru*

Таблица 1. Станции отбора проб водорослей *Saccharina latissima* и концентрации ООС в исследованных образцах

№ Ст	Место отбора проб	Содержание ООС, нг/г сухого веса *S. latissimi*						
	Баренцево море, глубина 9 м	МБО	ДБО	ТБО	ТТБО	ТФО	ТЦО	Общее содержание
1.	Кольский залив, губа Ретинская 69°11'20"с.ш. 36°36'87"в.д.	7.8	2.0	1.4	13.0	6.6	15.0	45.8
2.	Кольский залив, губа Грязная 69°04'07" с. ш. 33°17'36" в. д.	6.0	1.2	1.8	8.4	<0.1	<0.1	17.4
3.	Восточный Мурман, губа Зеленецкая 69°07'09" с.ш., 36°05'35" в.д.	19.0	3.6	1.0	11	<0.1	<0.1	34.6
4.	Восточный Мурман, губа Ярнышная 69°6’27.2" с.ш. 36°3’29.1"в.д.	43.0	14.0	7.8	8.8	<0.1	<0.1	73.6
5.	Восточный Мурман, губа Порчниха 69°4'30" с.ш. 36°16'44" в.д.	12.0	2.8	4.8	10.0	<0.1	<0.1	29.6

МБО – монобутилолово; ДБО – дибутилолово; ТБО – трибутилолово; ТТБО – тетрабутилолово; ТФО – трифенилолово; ТЦО – трициклогексилолово; ООС – оловоорганические соединения.

дериватизирующего агента использовались трипропилолово и тетраэтилборат натрия соответственно. ГХ/МС анализ экстрактов в целевом режиме SIM (Selection Ion Monitoring) проводился на хроматомасс-спектрометре единичного разрешения QP 2010 (*Shimadzu*). При анализе использовали капиллярную колонку средней полярности TR-5MS (60 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Идентификацию аналитов проводили по двум характеристическим ионам с учетом точных времен удерживания. Расчет массовой доли для каждого соединения производился методом внутреннего стандарта с использованием коэффициентов пересчета на катион органического олова, указанных в методике ISO [8]. Предел количественного измерения при указанных ГХ/МС параметрах и расчете на сухой вес составил 0.1 нг/г. Контроль растворителей и сорбента осуществлялся с теми же условиями концентрирования и хроматографии, что и для исследуемых образцов. Определяли шесть видов ООС – трициклогексилолово (ТЦГО), ТФО, тетрабутилолово (ТТБО), ТБО и его метаболиты – монобутилолово (МБО) и дибутилолово (ДБО).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализов продемонстрировали присутствие в пробах *S. latissima* всех видов изучаемых ООС (табл. 1).

Очевидно, что в тканях водорослей происходит накопление и, возможно, трансформация

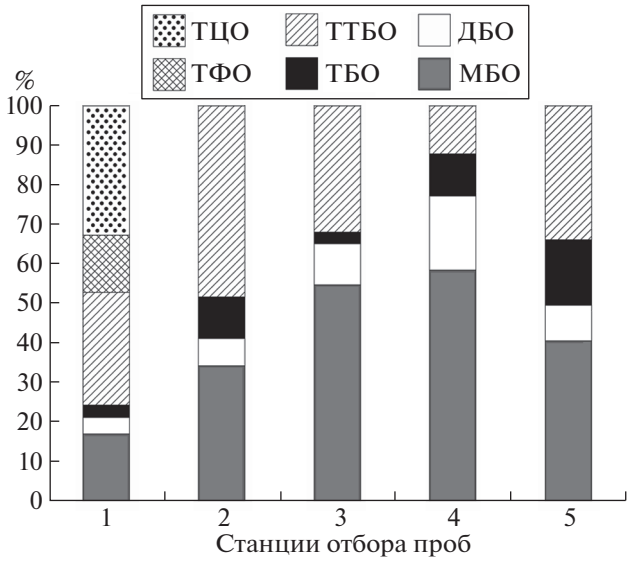

Рис. 1. Процентное соотношение ООС в образцах водорослей *S. latissima*.

ООС, сорбированных из воды. Источником алкилированных производных олова (ТТБО, ТБО, ДБО и МБО) является, преимущественно, водный транспорт. Среднее суммарное содержание четырех алкилированных ООС в образцах водорослей сублиторали Кольского залива (станции 1, 2) и Восточного Мурмана (станции 3–5) составили соответственно 21 и 46 нг/г. Во всех образцах доминировали МБО и ТТБО. Их вклад в общее содержание ООС составил в среднем 79%. Исключение составляет образец, отобранный в губе Ретинской (станция 1, Кольский залив), в котором помимо алкилированных соединений олова обнаружены ТФО и ТЦО. Этот факт свидетельствует о локальном загрязнении губы Ретинской пестицидами, содержащими соединения ТФО и ТЦО. На рис. 1 показано относительное содержание каждого ООС в образцах водорослей. Среди бутил-производных олова МБО является наиболее стабильным [2] и должно естественным образом накапливаться в донных осадках и водорослях при невысокой транспортной нагрузке на акваторию. Его доминирование говорит об активно проходящих процессах деструкции начальных соединений – ТБО и ТТБО, поступивших в водную среду. Преобладание в образцах водорослей ТТБО указывает на широкую распространенность этого соединения в качестве загрязнителя водной среды изучаемого региона, в частности Баренцева моря.

Полученные данные о концентрациях индивидуальных соединений (МБО, ДБО, ТБО, ТТБО, ТФО и ТЦО), а также сумма ООС в исследованных образцах (табл. 1) демонстрируют присутствие детектируемых количеств ООС в водорослях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали присутствие ООС во всех образцах водорослей-макрофитов. При этом наблюдаемые концентрации оказались невысокими. Зарегистрированное присутствие в каждом изученном образце ТТБО указывает на широкую распространенность этого загрязнителя в экосистеме Баренцева моря.

Анализ профилей бутил-производных олова выявил высокое долевое содержание МБО в тканях *Saccharina latissima*. Доминирование указанного метаболита свидетельствует об активно проходящих в водорослях процессах деструкции начальных соединений – ТБО и ТТБО, поступивших в водную среду. Полученные данные указывают также на дополнительное загрязнение губы Ретинской пестицидами, содержащими соединения ТФО и ТЦО.

Несмотря на умеренные выявленные концентрации ООС, эти соединения должны в дальнейшем контролироваться в воде, биоте, а также донных отложениях из-за потенциального риска для гидробионтов и экосистемы Баренцева моря в целом, учитывая возрастающий антропогенный прессинг на Мурманское побережье Баренцева моря: строительство на побережье комплексов по перегрузке, переработке углеводородного сырья.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в сборе материала сотруднику ММБИ РАН М. Макарову и сотруднику ПГИ РАН А. Роскуляку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Майстренко В.Н., Клюев Н.А.* Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. М.: БИНОМ, 2004, 323 с.

2. *De Carvalho Oliviera R., Santelli R.E.* Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. // Talanta. 2010. V. 82. P. 9–24. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.04.046

3. *Ghazi D., Rasheed Z., Yousif E.* Review of organotin compounds: chemistry and applications. // International journal of research in engineering and innovation. 2018. V. 2(4). P. 340–348. https://doi.org/10.32474/AOICS.2018.03.000161

4. *Richter J., Fettig I., Philipp R., Jakubowski N.* Tributyltin—critical pollutant in whole water samples—development of traceable measurement methods for monitoring under the European Water Framework Directive (WFD) 2000/60/EC. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2015. V. 22. P. 9589–9594. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4614-4

5. Environmental health criteria for tributyltin compounds/ International Programme on Chemical Safety // World Heals Organization. Geneva. 1990.

6. *De Castro T.F., Junior A.S.V., Padilha F.F., Droppa-Almeida D., Saalfeld G.Q., Pires D.M., Pereira J.R., Corcini C.D., Colares E.P.* Effects of exposure to triphenyltin (TPT) contaminant on sperm activity in adulthood of Calomys laucha exposed through breastfeeding. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 8280–8288. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04365-1

7. *Su G., Zhang X., Raine J.C., Xing L., Higley E., Hecker M., Giesy J.P., Yu H.* Mechanisms of toxicity of triphenyltin chloride (TPTC) determined by a live cell reporter array // Environ. Sci. Pollut. Res. 2013. V. 20. P. 803–811. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1280-7

8. International Organization for Standardization. Water quality – Determination of selected organotin compounds – Gas chromatographic method. ISO 17353:2004 (E).

ORGANOTIN COMPOUNDS (OTs) IN *SACCHARINA LATISSIMA* (Phaeophyceae) FROM THE BARENTS SEA

L. O. Metelkova[a], Z. A. Zhakovskaya[a], G. I. Kukhareva[a], G. M. Voskoboinikov[b,#], and Academician of the RAS G. G. Matishov[b]

[a] *Scientific Research Centre for Ecological Safety of the Russian Academy of Sciences (SRCES RAS), Saint-Petersburg, Russian Federation*

[b] *Murmansk Marine Biological Institute, RAS (MMBI RAS), Murmansk, Russian Federation*

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

An assessment of the degree of contamination with organotin compounds – monobutyltin, dibutyltin, tributyltin, tetrabutyltin, triphenyltin and tricyclohexyltin of *Saccharina latissima*, which dominates among macrophyte algae in the sublittoral of the Kola Bay and the Eastern Murman of the Barents Sea, was carried out. The obtained results showed moderate contamination of the studied samples with organotin compounds. The total content of six tin compounds was in the range 17–74 ng / g (dry weight) in the algae samples. An analysis of the degradation indices of butyl tin derivatives indicated the actively occurring transformation processes of tributyltin and tetrabutyltin in algae.

Keywords: Barents Sea, *Saccharina latissima*, organotins

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 135–138

УДК 577.29

МУТАНТНЫЕ МЫШИ WAL ИМЕЮТ МУТАЦИЮ, АССОЦИИРОВАННУЮ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

© 2021 г. Э. С. Чермных[1,*], Д. М. Щепетов[1], член-корреспондент РАН Е. А. Воротеляк[1]

Поступило 21.10.2020 г.
После доработки 31.10.2020 г.
Принято к публикации 31.10.2020 г.

Мутация *waved alopecia (wal)* возникла у мышей спонтанно. Фенотипически мутация *wal* в гомозиготном рецессивном состоянии проявляется волнистым шерстным покровом. Со временем развивается частичное облысение, что приводит к разрежению шерстного покрова у мышей. Молекулярная природа генетического повреждения *wal* до сих пор остается неизвестной, однако определены координаты локуса, в котором находится ген *wal* – участок хромосомы длиной около 10 млн п.о. на 14-й хромосоме у мыши. Мы исследовали локус *wal* с помощью секвенирования экзонов генов-кандидатов, в которых ожидали обнаружить мутацию, а также провели полногеномное секвенирование в попытке идентифицировать причину мутации *wal*. Последовательности экзонов генов-кандидатов, расположенных в данной области, не несли изменений, которые могли бы повлечь изменение структуры белка. Однако вне зоны *wal* была обнаружена мутация в гене *Slc9a9*, вероятно, не связанная с фенотипом *wal*. По данным литературы мутация в гене *Slc9a9* приводит к расстройствам аутистического спектра. Это впервые обнаруженная спонтанная мутация в гене *Slc9a9* у мышей.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, мутантные мыши, расстройства аутистического спектра, Slc9a9

DOI: 10.31857/S2686738921020050

Спонтанно возникающие мутации у мыши служат основой для понимания функции генов на протяжении более 100 лет. Спонтанная мутация *waved alopecia (wal)* была исследована и описана Сорокиной и Бландовой в 80-х годах XX века. У мутантных мышей *wal/wal* формируется волнистый шерстный покров, через месяц после рождения количество волосяных фолликулов резко снижается, а оставшиеся фолликулы деформируются и не продуцируют здоровых нормальных волос (Сорокина, Бландова, 1980). В возрасте 2 мес у мышей наблюдается алопеция, которая представляет собой разреженный волосяной покров, образуются дермальные кисты. Облысение не затрагивает область головы и хвоста (Сорокина, Бландова, 1980; Nakamura et al., 2001). Ген *wal* действует в эктодермальных клетках волосяного фолликула (Малинина и др 1999). По данным Сорокиной и Бландовой ген *wal* расположен на 14-й хромосоме на расстоянии 47.0 cM (Sorokina, Blandova, 1985). Ближайшими соседними картированными генами рядом с локусом wal являются гены *Pgia29* и *Klf12* (Нестерова, 2010).

Первичной задачей нашего исследования было выявление причины мутантного фенотипа мыши *wal/wal* на молекулярном уровне, а именно поиск мутантного гена и выявление типа мутации. В ходе работы нам не удалось детектировать изменений ДНК в зоне *wal*, которые приводили бы к изменению структуры белков, закодированных в соответствующем локусе. Однако у мышей *wal* обнаружена мутация в гене *Slc9a9*, ассоциированная с расстройствами аутистического спектра.

В работе были исследованы мыши *wal*, полученные в Институте общей генетики и мыши *wal*, приобретенные в питомнике “Андреевка” ФГБУН “Научный центр биомедицинский технологий” ФМБА России. Для того чтобы добиться наибольшей генетической идентичности между мутантной линией мышей *wal* и референсной Balb/c и сузить вариации генома вне локуса *wal*, мы провели возвратное скрещивание (бэккросс) этих линий. Мутантное потомство бэккросса линии *wal/wal* на исходную Balb/c отбирали по характерному волнистому фенотипу (рис. 1). В первую очередь мы исследовали гены-кандидаты, ассоциированные с мутацией в локусе *wal*. В локус *wal* входит 8 генов: *Pcdh9, Klhl1, Dach1, Mzt1, Bora, Dis3, Pibf1* и *Klf5*. Проанализировав данный локус,

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*

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

Рис. 1. Фенотип мышей *wal*. Для сравнения на фото представлены здоровая мышь Balb/c (снизу) и мышь с мутацией *wal* (сверху).

мы выбрали потенциального гена-кандидата – протокадгерин *Pcdh9*, повреждение в котором может приводить к нарушениям в коже и ее придатках. Гены *Pcdh20* и *Pcdh17* не входят в локус *wal*, но располагаются вблизи, поэтому также были отобраны нами в качестве кандидатов. Мы провели секвенирование по Сенгеру экзонов указанных генов-кандидатов с целью выявления мутации, которая может привести к изменению структуры белка. Однако генных вариаций, приводящих к изменению структуры белка, обнаружено не было, последовательности генов *Pcdh9, Pcdh17* и *Pcdh20* полностью соответствовали стандартным референсным последовательностям этих генов у мыши (GRCm38/mm10), указанных в базе UCSC.

Поскольку остальные гены локуса *wal* не представляли интереса (нарушения в некоторых из них не совместимы с жизнью, в остальных – не затрагивают кожу), мы предположили, что мутация может быть ассоциирована с регуляторной областью гена или его интронными участками и провели полногеномное секвенирование мышей *wal* в сравнении с мышами линии Balb/c.

Было проведено полногеномное секвенирование двух образцов мышей *wal* и контрольной мыши Balb/c. Биоинформатическую обработку проводили, сравнивая геномы 3 особей, – первичную мышь *wal*, мышь *wal*, полученную в результате бэккросса и мышь Balb/c, а также проводили выравнивание на стандартную референсную последовательность генома мыши (GRCm38/mm10).

Координаты локуса *wal* включают примерно 10 млн п.о. (chr14:91,114,870-100,150,000). Предположив, что координаты могут быть неточными, мы расширили зону поиска на 10 млн п.о. В геномном интервале chr14:85,000,000-105,000,000, где ранее был картирован локус *wal*, у мутантной мыши мы не обнаружили вариантов, приводящих к изменению последовательностей белковых продуктов генов (миссенс, нонсенс, делеций и инсерций в кодирующих участках генов, мутаций в канонических сайтах сплайсинга, мутаций в старт- и стоп-кодонах), что подтвердило результаты секвенирования по Сенгеру. Не было найдено ни одной мутации структурного гена и на протяжении всей хромосомы 14. При поиске рассматривались только варианты, присутствующие у мутантных образцов в гомозиготном состоянии и отсутствующие у контрольного образца.

Среди остальных вариантов была проведена фильтрация по следующим параметрам: зиготность: гомозиготное состояние; ненахождение в участках однонуклеотидных и прочих повторов (в частности, по данным RepeatMasker); отсутствие варианта в базе dbSNP и у мышей различных линий, в том числе Balb/cJ, согласно базе Sanger Institute Mouse Genome Projects; нуклеотидная консервативность позиции у млекопитающих не менее 90%, по данным множественного выравнивания геномов MultiZ 60-Way. С учетом этих критериев нами не обнаружено генетических изменений в интронных областях и в межгенных участках в интервале chr14:85,000,000–105,000,000, которые могли бы уложиться в простую молекулярную модель, объясняющую природу облысения мышей *wal*.

Интересно отметить, что у мышей описана мутация гена *Scel* (белок sciellin), фенотипически схожая с мутацией *wal* (Baden et al., 2005). Белок sciellin является структурным белком роговой оболочки терминально дифференцированных кератиноцитов (Kvedar et al., 1992), был картирован на 14-й хромосоме рядом с областью *wal*. Однако у исследованных нами мышей этот белок не затронут. Также в исследованиях с помощью иммуногистохимического анализа было показано, что мыши *wal* синтезируют полноценный белок sciellin (Baden et al., 2005).

Интересной находкой, хоть вероятно и не имеющей отношения к основному фенотипу, явилась мутация в гене *Slc9a9*, находящемся вне локуса *wal* на другой хромосоме. Выявленный в гомозиготном состоянии вариант chr9:95019132G>GA (инсерция одного нуклеотида – аденина) расположен в 10 экзоне гена *Slc9a9* и приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с 374 кодона (p.Asn374fs, ENSMUST00000033463) (рис. 2).

Эта мутация была обнаружена как у исходной мутантной мыши *wal*, так и у полученной после бэккросса. Из литературы известно, что мыши, нокаутные по гену *Slc9a9*, демонстрируют, в чис-

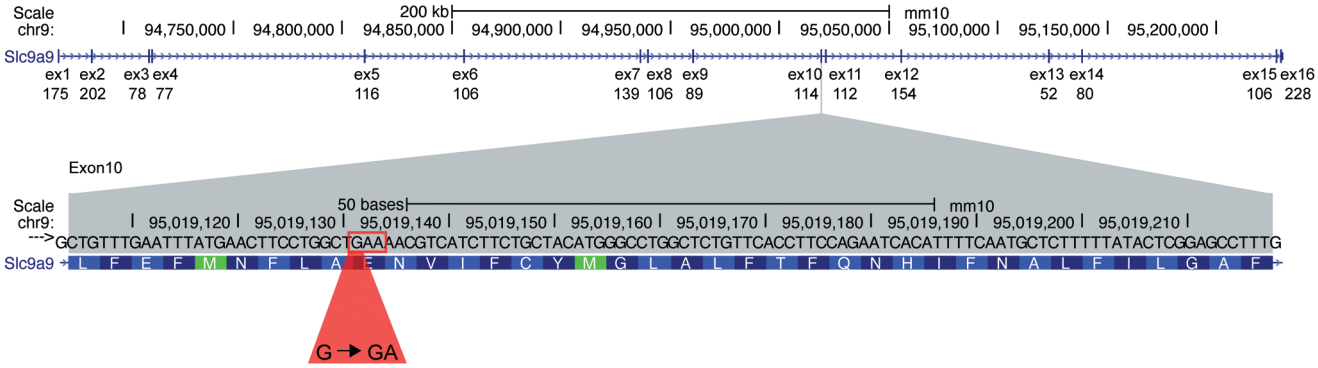

Рис. 2. Молекулярная природа мутации в гене *Slc9a9*. Выявленный в гомозиготном состоянии вариант chr9:95019132G>GA (инсерция одного нуклеотида – аденина) расположен в 10 экзоне гена Slc9a9 и приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с 374 кодона. Координаты даны по сборке генома GRCm38/mm10 из браузера UCSC. Экзоны пронумерованы, цифры под экзонами указывают на их длину.

ле ряда прочих признаков, нарушения поведения, сходные с расстройствами аутистического спектра, и другие нейропсихиатрические нарушения, но признаки алопеции не проявляют (Patak et al., 2016; Yang et al., 2016; Ullman et al., 2018). По совокупности сведений вариант следует расценивать как вероятно патогенный в статусе вторичной (случайной) находки. В мировой литературе еще не описаны мыши со спонтанной мутацией в гене *Slc9a9*, однако генно-инженерные мутанты созданы (Yang et al., 2016; Ullman et al., 2018).

Таким образом, в геномном интервале chr14:85,000,000-105,000,000, где ранее был картирован локус *wal*, у мутантной мыши не обнаружено вариантов, приводящих к изменению последовательностей белковых продуктов генов. Вероятно, что у мутации нестандартный тип (например, вставка ретротранспозона в область регуляторного элемента). Можно также предположить, что локус определен неверно. Еще одной возможной причиной можно рассматривать ограничения биоинформатического анализа. Метод не позволяет выявлять вариации длины повторов (в том числе экспансии триплетов), а также мутации в генах, у которых в геноме существует близкий по последовательности паралог (псевдоген). Метод не предназначен для определения фазы пар гетерозиготных мутаций, а также для оценки уровня метилирования, выявления сложных хромосомных перестроек, полиплоидии, выявления мутаций в состоянии мозаицизма.

Мутация *wal* представляет большой интерес и заслуживает дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ф.А. Коновалову и Е. Толмачевой (Лаборатория Клинической Биоинформатики) за биоинформатическую обработку данных полногеномного секвенирования генома мыши.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-01022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sorokina J.D., Blandova Z.K.* Waved alopecia // *Mouse News Lett.* 1985; 73: 23.
2. *Сорокина Ю.Д., Бландова З.К.* Наследственное изменение кожного и шерстного покрова у мышей BALB/c-walY. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных: *Материалы Всесоюз. конф. М.*, 1980: 79–80.
3. *Nakamura M., Sundberg J.P., Paus R.* Mutant laboratory mice with abnormalities in hair follicle morphogenesis, cycling, and/or structure: annotated tables. // *Exp Dermatol.* 2001; 10 (6): 369–90. https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2001.100601.x
4. *Малинина Н.А., Мартынова М.Ю., Конюхов Б.В.* Мутантный ген wal действует в клетках волосяных фолликулов. *Онтогенез.*1999; 30 (5): 362–365.
5. *Нестерова А.П.* Взаимодействие мутантных генов Fgf5go-Y, hr, we и wal, нарушающих развитие и рост волос у мыши. 2010 год, Диссертация, кандидат биологических наук.
6. *Kvedar J.C., Manabe M., Phillips S.B., Ross B.S., Baden H.P.* Characterization of sciellin, a precursor to the cornified envelope of human keratinocytes. // *Differentiation*. 1992; 49 (3): 195–204. https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1992.tb00667.x
7. *Baden H.P., Champliaud M.F., Sundberg J.P., Viel A.* Targeted deletion of the sciellin gene resulted in normal

development and maturation. // *Genesis*. 2005; 42 (4): 219–228.
https://doi.org/10.1002/gene.20133

8. *Patak J., Hess J.L., Zhang-James Y., Glatt S.J., Faraone S.V.* SLC9A9 Co-expression modules in autism-associated brain regions. // *Autism Res*. 2017; 10 (3): 414–429.
https://doi.org/10.1002/aur.1670
9. *Yang L., Faraone S.V., Zhang-James Y.* Autism spectrum disorder traits in Slc9a9 knock-out mice. // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2016; 171B (3): 363–376.
https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32415
10. *Ullman J.C., Yang J., Sullivan M., Bendor J., Levy J., Pham E., Silm K., Seifikar H., Sohal V.S., Nicoll R.A., Edwards R.H.* A mouse model of autism implicates endosome pH in the regulation of presynaptic calcium entry. // *Nat. Commun*. 2018; 9 (1): 330.
https://doi.org/10.1038/s41467-017-02716-5

MUTANT WAL MICE HAVE MUTATION ASSOCIATED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

E. S. Chermnykh[a,#], D. M. Schepetov[a], and Corresponding Member of RAS E. A. Vorotelyak[a]

[a] *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

The *waved alopecia (wal)* mutation arose spontaneously in mice. Phenotypically, the *wal* mutation in a homozygous recessive state is manifested by a wavy coat. Over time, partial baldness develops, which leads to a thinning of the coat in mice. The molecular nature of the genetic defect in *wal* is still unknown; however, the coordinates of the locus in which the *wal* gene is located, a chromosome section of about 10 million bp in length, has been determined on chromosome 14 in a mouse. We examined the *wal* locus by sequencing the exons of candidate genes in which the mutation was expected, and performed genome-wide sequencing to identify the cause of the *wal* mutation. The sequences of exons of candidate genes located in this region did not carry changes that could lead to a change in the structure of the protein. However, outside the *wal* zone, a mutation in the *Slc9a9* gene was found, which is probably not associated with the *wal* phenotype. According to the literature, a mutation in the *Slc9a9* gene leads to autism spectrum disorders. This is the first discovered spontaneous mutation in the *Slc9a9* gene in mice.

Keywords: whole genome sequencing, mutant mice, autism spectrum disorders, Slc9a9

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 139–142

УДК 612.82

ВЛИЯНИЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ АСИММЕТРИЧНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ЗРИТЕЛЬНОЙ АФФЕРЕНТАЦИИ НА АКТИВАЦИЮ НЕЙРОНОВ КАУДОМЕДИАЛЬНОГО МЕЗОПАЛЛИУМА ПРИ РЕАКЦИИ ЗАТАИВАНИЯ У НЕЗРЕЛОРОЖДАЮЩИХСЯ ПТЕНЦОВ

© 2021 г. Е. В. Корнеева[1,*], А. А. Тиунова[2], Л. И. Александров[1], Т. Б. Голубева[3]

Представлено академиком РАН М.В. Угрюмовым
Поступило 29.07.2020 г.
После доработки 09.11.2020 г.
Принято к публикации 09.11.2020 г.

Работа заключалась в исследовании влияния асимметричной пренатальной зрительной стимуляции на активацию нейронов каудомедиального мезопаллиума (СММ) у 9-суточных птенцов мухоловки-пеструшки во время аудионаправляемого затаивания. Исследовали 4 группы птенцов: 1 и 2 группы, соответственно, зрячие и незрячие птенцы, эмбриональный период и вылупление которых проходили при свете; 3 и 4 группы – зрячие и незрячие птенцы, эмбриональный период и вылупление которых проходили в темноте. Незрячим птенцам за 2 ч до начала эксперимента заклеивали глаза светонепроницаемыми колпачками. Исследовали экспрессию белка c-Fos. Показано, что только в группе вылупившихся при свете незрячих птенцов плотности активированных при затаивании нейронов в правом и левом СММ были различными. Это свидетельствует о том, что наличие или отсутствие асимметричной эмбриональной зрительной афферентации может приводить к формированию различных стратегий использования зрительного обеспечения оборонительного поведения.

Ключевые слова: птицы, птенцы, зрительная афферентация, оборонительное поведение, каудомедиальный мезопаллиум, c-Fos

DOI: 10.31857/S268673892102013X

Сенсорная стимуляция является важнейшим фактором, определяющим развитие нервной системы любого организма. Особое значение этот фактор приобретает в период пренатального онтогенеза [1, 2]. Птицы являются уникальной моделью для исследования влияния эмбриональной сенсорной стимуляции на онтогенетическое формирование как самой сенсорной системы, так и последующего поведения организмов. Это связано с наличием в эмбриогенезе птиц периода естественной асимметрии зрительной стимуляции. На последних сроках эмбриогенеза голова эмбрионов повернута таким образом, что правый глаз располагается непосредственно под скорлупой яйца и может получать световую афферентацию. Исследования показали, что эмбрионально обусловленная асимметрия зрительной афферентации в сочетании с полным зрительным перекрестом приводит у птиц к различному формированию морфофункциональных проекций правого и левого глаз [3, 4]. Целью данной работы было выяснение вопроса о том, влияют ли особенности пренатальной сенсорной стимуляции на формирование паттернов активации нейронов при реализации постнатального поведения. Известно, что изменения зрительной афферентации в раннем онтогенезе могут в значительной степени модулировать развитие нейрональной активности в слуховых областях [5, 6]. Ранее нами было показано, что акустически направляемое оборонительное поведение у птенцов мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) с появлением предметного зрения на 9-е сутки становится более выраженным [7]. Картирование нейрональной активности путем детекции транскрипционного фактора

[1] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия*
[2] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия*
[3] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
**e-mail: eko.ihna@mail.ru*

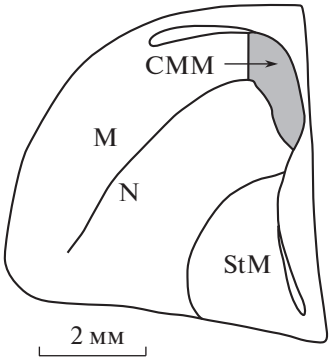

Рис. 1. Рисунок фронтального среза правого полушария 9-суточного птенца мухоловки-пеструшки на уровне каудомедиального мезопаллиума. Серым цветом выделена область, в которой производили подсчет c-Fos- позитивных клеток. M – мезопаллиум, CMM — каудомедиальный мезопаллиум, N – нидопаллиум, StM – медиальный стриатум. Масштаб – 2 мм.

c-Fos в теленцефалических слуховых структурах показало, что исключение зрительной афферентации из обеспечения оборонительного поведения незадолго перед экспериментом вызывает снижение его индукции в структурах правого полушария [8]. Мы предположили, что такая особенность связана с пренатальной асимметричной световой стимуляцией. Задача данной работы заключалась в проверке этой гипотезы, а именно в сравнивании нейронального ответа слуховых структур 9-суточных птенцов, получивших или не получивших асимметричную пренатальную зрительную стимуляцию при акустически направляемом оборонительном поведении. В качестве маркера нейрональной активности использовали транскрипционный ответ раннего гена c-Fos, неоднократно использовавшийся для картирования нейрональной активности мозга в различных поведенческих ситуациях [9].

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными по протоколу, утвержденному этической комиссией ИВНД и НФ РАН. Исследования проведены на 4 группах 9-суточных птенцов мухоловки-пеструшки, по 5 птенцов в каждой группе. Птенцы 1 и 2 групп воспитывались в условиях нормальной зрительной среды. Их вылупление проходило в естественных условиях высиживания самкой, и в дальнейшем на протяжении всего времени эти птенцы находились в естественной среде обитания. Вылупление птенцов 3 и 4 групп проходило в темноте. С этой целью за 2 сут до предполагаемого срока вылупления птенцов яйца забирали из естественных гнезд и переносили в неосвещенный инкубатор. Физические и сенсорные условия инкубирования (за исключением освещенности) были максимально приближены к естественным. После вылупления птенцов забирали из инкубатора и переносили в родные гнезда, где они находились до начала эксперимента. Половине птенцов, вылупившихся при каждом из условий освещенности, за 2 ч до начала эксперимента глаза заклеивали светонепроницаемыми колпачками (группы незрячих птенцов темнового и светового вылупления). Две оставшиеся группы оставались зрячими (группы зрячих птенцов темнового и светового вылупления). Таким образом были сформированы группы птенцов: 1 – зрячие птенцы светового вылупления, 2 – незрячие птенцы светового вылупления, 3 – зрячие птенцы темнового вылупления и 4 – незрячие птенцы темнового вылупления. На 9-е сутки птенцам всех групп, находящимся в стандартных дуплянках, в течение 15 мин проигрывали видоспецифический сигнал тревоги. Через 90 мин после начала эксперимента птенцов декапитировали, их мозг замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70°C. Иммуногистохимическую детекцию белков c-Fos проводили на серийных фронтальных криостатных срезах толщиной 20 мкм по стандартной методике [8, 10]. Осуществляли панорамное сканирование срезов и в каудомедиальном мезопаллиуме (CMM), структуре, связанной с восприятием видоспецифической вокализации, проводили количественный анализ паттернов экспрессии. Ядра иммунопозитивных клеток считали с использованием программы анализа изображений Image Pro Plus. Порог минимальной оптической плотности, выделяющий меченые клетки, но исключающий фоновую окраску, устанавливали вручную. Проводили тотальный подсчет иммунопозитивных клеток в выделенной области (рис. 1).

Определяли плотность c-Fos позитивных нейронов в правых и левых структурах CMM как количество иммунопозитивных нейронов на единицу площади исследуемых структур на каждом из срезов. Для определения соотношения плотностей c-Fos-позитивных нейронов в правом и левом CMM был введен коэффициент симметрии как отношение плотности c-Fos-позитивных нейронов в правом CMM к таковой в левом CMM. Для проверки отличия коэффициентов симметрии от 1 (1 соответствовала полной симметрии) проводилась статистическая обработка по t-критерию для одной выборки.

Статистический анализ влияний факторов освещенности в разные периоды проводился при использовании факторного анализа ANOVA, различия между группами оценивались при помощи LSD-теста. Достоверными считались отличия при $p < 0.05$.

Визуальное исследование срезов мозга на уровне CMM показало выраженную иммунореактивность нейронов данной области.

Таблица 1. Плотности c-Fos-позитивных нейронов в правом и левом СММ, $n/1$ мм^2

	зрячие птенцы светового вылупления	незрячие птенцы светового вылупления	зрячие птенцы темнового вылупления	незрячие птенцы темнового вылупления
Правый СММ	368.2 ± 211.2	261.5 ± 91.5	705.6 ± 157.4	401.3 ± 198.8
Левый СММ	330.9 ± 201.9	322.3 ± 91.7	831.4 ± 242.1	376.2 ± 186.8

Анализ плотностей c-Fos-позитивных нейронов в правом и левом СММ выявил, что этот показатель на разных срезах ощутимо различался, что давало очень большой разброс значений (табл. 1).

В этой связи статистический анализ не выявил значимых различий плотностей иммунопозитивных нейронов в разных группах, что не позволило использовать показатель плотности для статистического анализа.

Исследование коэффициентов симметрии плотностей иммунопозитивных нейронов в СММ в разных экспериментальных группах выявило, что этот показатель достоверно отличается от 1 только в группе незрячих птенцов светового вылупления ($t = -2.87422$, $p = 0.04528$) (рис. 2).

Факторный анализ не обнаружил значимой разницы между влияниями как фактора освещенности в позднем эмбриогенезе, так и фактора наличия или отсутствия зрительной афферентации во время эксперимента. Однако он показал значимость эффекта взаимодействия между анализируемыми факторами ($F = 8.1935$, $p = 0.011287$).

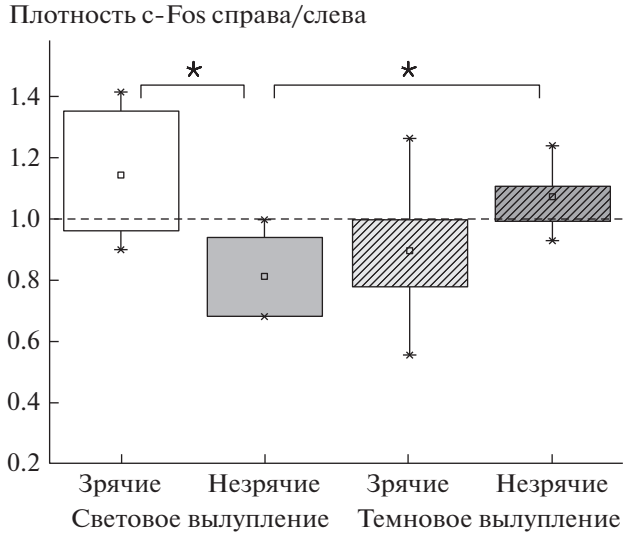

Рис. 2. Коэффициент симметрии плотностей c-Fos-позитивных нейронов в правом и левом СММ. По вертикали – отношение количества c-Fos-позитивных клеток на 1 мм^2 в правом СММ к левому СММ. По горизонтали – группы птенцов. Нижняя и верхняя границы прямоугольников соответствуют первому и третьему квартилю, точка в прямоугольнике – среднему арифметическому, разбросы – минимальному и максимальному наблюдаемому выборочному значению. * – значимые различия коэффициентов симметрии между группами птенцов при $p < 0.05$.

Индивидуальные сравнения между группами выявили достоверно более низкие показатели коэффициента симметрии плотностей иммунопозитивных нейронов в СММ в группе незрячих птенцов светового вылупления по сравнению с группой зрячих птенцов светового вылупления ($p = 0.015137$) и группой незрячих птенцов темнового вылупления ($p = 0.049872$) (рис. 2).

Таким образом, наши данные показали, что содержание яиц в темноте на поздних сроках инкубационного периода, устраняющее световую стимуляцию правого глаза эмбрионов, не приводит к изменению соотношения нейронов правого и левого СММ, активирующихся при реализации оборонительного поведения у 9-суточных птенцов. Однако тестирование вклада зрительной афферентации путем ее исключения незадолго до начала эксперимента выявило существенные различия между птенцами, вылупление которых проходило в темноте и на свету. Только у птенцов, развивающихся и вылупившихся при нормальном световом режиме, мы наблюдали асимметричный вклад зрительной афферентации в активацию нейронов правого и левого СММ. Нейроанатомические исследования продемонстрировали, что в пределах зрительных ядер среднего и промежуточного мозга птиц наблюдается асимметричное распределение разных фракций нейронов, а инкубирование яиц в темноте нарушает такой паттерн распределения. [11]. Таким образом, асимметрию зрительного вклада в оборонительную интеграцию можно связать с асимметрией эмбриональной световой стимуляции, а исключение этой стимуляции меняет паттерн активирующихся при оборонительном поведении нейронов. Иными словами, наличие или отсутствие асимметричной эмбриональной зрительной афферентации у птенцов мухоловки-пеструшки может приводить к формированию различных стратегий использования сенсорного обеспечения оборонительного поведения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-013-00176.

КОНФЛИКТОВ ИНТЕРЕСОВ

Конфликтов интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными, а именно Конвенции ЕС 2010 г. (Директива 2010/63 / ЕС) по протоколу, утвержденному этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lickliter R.* The Role of Sensory Stimulation in Perinatal Development: Insights From Comparative Research for Care of the High-Risk Infant // Journal of developmental and behavioral pediatrics. 2000. V. 21. № 6. P. 437–447.
2. *Шишелова А.Ю., Раевский В.В.* Влияние пре- и постнатальных факторов на формирование ранних поведенческих реакций // Доклады Российской академии наук. 2018. Т. 479. № 3. С. 351–353. https://doi.org/10.7868/S0869565218090268
3. *Rogers J.* A Matter of Degree: Strength of Brain Asymmetry and Behaviour // Symmetry. 2017. V. 9. № 57. https://doi.org/10.3390/sym9040057
4. *Schmitz J., Güntürkün O., Ocklenburg S.* Building an Asymmetrical Brain: The Molecular Perspective // Frontiers in Psychology. 2019. V. 10. Article 982.
5. *Mowery T.M., Kotak V.C., Sanes D.H.* The onset of visual experience gates auditory cortex critical periods // Nature Communications. 2016. V. 7. Article 10416
6. *Huber E., Chang K., Alvarez I.* Early Blindness Shapes Cortical Representations of Auditory Frequency within Auditory Cortex // The Journal of Neuroscience. 2019. V. 39. № 26. P. 5143–5152.
7. *Корнеева Е.В., Александров Л.И., Голубева Т.Б. и др.* Роль зрительной афферентации в фомировании ранних форм оборонительного поведения птенцов мухоловки- // Журнал высшей нервной деятельности. 2005. Т. 55. № 3. С. 353–359.
8. *Корнеева Е.В., Тиунова А.А., Александров Л.И., и др.* Зрительная афферентация влияет на экспрессию ранних генов c-fos и zenk в слуховых теленцефалических центрах птенцов мухоловки-пеструшки при акустически направляемой реакции // Журнал высшей нервной деятельности. 2014. Т. 64. № 3. С. 324–333.
9. *Jaworski J., Kalita K., Knapska E.* C-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory // Acta Neurobiologiae Experimentalis. 2018. V. 78. № 4. P. 287–296.
10. *Корнеева Е.В., Тиунова А.А., Александров Л.И., и др.* Активация WULST у птенцов мухоловки пеструшки при пищевом поведении, вызываемом оформленным зрительным стимулом // Журнал высшей нервной деятельности. 2016. Т. 66. № 1. С. 74–78.
11. *Letzner S., Manns M., Güntürkün O.* Light-dependent Development of the Tectorotundal Projection in Pigeons // The European journal of neuroscience. 2020. May 9. https://doi.org/10.1111/ejn.14775

INFLUENCE OF NATURAL ASYMMETRIC EMBRYONIC VISUAL AFFERENTATION ON THE NEURONAL ACTIVATIONS IN CAUDOMEDIAL MESOPALLIUM DURING THE FREEZING RESPONSE IN ALTRICIAL NESTLING

E. V. Korneeva[a,#], A. A. Tiunova[b], L. I. Alexandrov[a], and T. B. Golubeva[c]

[a] *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russian Federation*

[b] *P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russian Federation*

[c] *Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: eko.ihna@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS M.V. Ugryumov

The study was designed to investigate the role of asymmetric prenatal visual stimulation on the activation of caudomedial mesopallium (CMM) neurons in 9-day-old pied flycatcher nestlings during auditory-guided freezing. Four groups of nestlings were studied: groups 1 and 2 – nestlings with normal vision and visually deprived, respectively, who were incubated and hatched in normal light environment; groups 3 and 4 – nestlings with normal vision and visually deprived, respectively, who were incubated and hatched in the dark. Eyes of visually deprived nestlings were covered with non-transparent cups 2 hours before experiment. Expression of c-Fos was studied. It was shown that densities of neurons activated during freezing response differed in right vs left CMM only in the group of visually deprived nestlings incubated under light. This suggests that the presence or absence of the asymmetric embryonic visual afferentation may result in the development of different strategies of integration of the visual system into defense behavior.

Keywords: Birds, nestlings, visual afferentation, defense behavior, caudomedial mesopallium, c-Fos

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 143–147

УДК 581.1+574.2

ПРОДУКТИВНОСТЬ И ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ ЗАСУШЛИВОГО КЛИМАТА

© 2021 г. О. А. Розенцвет[1,*], Е. С. Богданова[1], В. Н. Нестеров[1], академик РАН С. Н. Шевченко[2], А. Л. Бакунов[3], А. В. Милехин[3], С. Л. Рубцов[3]

Поступило 15.12.2020 г.
После доработки 24.12.2020 г.
Принято к публикации 25.12.2020 г.

Впервые показана взаимосвязь показателей морфологии, физиологии, биохимии и продуктивности растений картофеля на примере среднеспелого сорта (с.) Сиверский и среднераннего с. Третьяковка. Урожайность с. Сиверский составила 512 г/на растение или 24.4 т/га, что оказалось в 1.6 раза выше, чем с. Третьяковка. Надземная биомасса растений картофеля с. Сиверский отличается повышенным содержанием фотосинтетических пигментов, большей изменчивостью показателей белкового и липидного метаболизма, а также более интенсивными процессами окисления и эффективной системой антиокислительной защиты, что может являться залогом его большей урожайности. Многомерным статистическим анализом установлено, что в климатических условиях средней полосы России 2020 г. наибольшая взаимосвязь с продуктивностью выявлена для таких показателей, как число устьиц на единицу площади листа, число стеблей, содержание пигментов, фосфолипидов, нейтральных липидов и водорастворимых белков.

Ключевые слова: Solanum tuberosum, засухоустойчивость, продуктивность, белки, липиды, пролин, фотосинтетические пигменты

DOI: 10.31857/S2686738921020232

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является третьим (после риса и пшеницы) и наиболее важным видом сельскохозяйственных культур, употребляемых в пищу человеком [1]. Однако картофель остается уязвимым для биотических и абиотических стрессов [2]. В частности, культивируемый картофель подвержен засухе, и даже кратковременный дефицит воды приводит к снижению урожайности клубней [3, 4]. По имеющимся оценкам одними из общих тенденций изменений биосферы являются аридизация климата и расширение площади пустынных, степных территорий [5]. В течение 21-го века высока вероятность ускорения динамики уже наблюдаемых изменений климата. Ожидаемые перемены могут привести к снижению урожайности картофеля на 26 – 32% в ближайшие десятилетия [6, 7]. В связи с этим необходимо не только создавать новые сорта картофеля, более приспособленные к новым условиям, но и выявлять механизмы толерантности с/хоз. культур с использованием подходов современной фундаментальной науки, что облегчит отбор сортов с нужными свойствами.

Для представителей дикорастущих видов аридной флоры характерна тенденция к снижению запасания углеводов (крахмала) и повышению роли белков и жиров в качестве запасных метаболитов [8]. Адаптивный смысл этой перестройки – более прочное связывание воды белками и липидами и их большая энергоемкость [9]. Это означает, что экологические факторы (например, климатические и биолитогенные) ведут к активизации биохимических адаптивных

[1] *Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, Россия*
[2] *Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Самара, Россия*
[3] *Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова, Безенчук, Россия*
**e-mail: olgarozen55@mail.ru*

Таблица 1. Морфологические параметры надземной массы двух сортов картофеля

Сорт	Целое растение, $n = 5$				Боковые доли листа, $n = 10$		
	Высота, 50 дней от посадки, см	Высота, 60 дней от посадки, см	Прирост, %	Число стеблей на растение, шт.	Длина, см	Ширина, см	Число устьиц, шт.
Сиверский	43.4 ± 2.3^a	59.1 ± 6.2^a	36.2 ± 2.9^a	8.6 ± 2.0^a	51.7 ± 1.8^a	30.5 ± 1.0^a	38333 ± 2138^a
Третьяковка	52.9 ± 4.1^b	66.6 ± 7.1^a	25.9 ± 2.5^b	4.2 ± 1.5^b	47.7 ± 2.3^a	26.9 ± 1.7^b	28036 ± 1268^b

n – число растений/долей листа, выбранных для анализа. Разными буквами обозначены достоверные различия между вариантами опытов при $p < 0.05$.

реакций, которые проявляются в трансформации продуктов метаболизма растений.

Урожайность является важным аспектом в программах селекции [10]. Формирование урожая осуществляется в ходе продукционного процесса – сложной и интегрированной функции растений, основу которой составляют генетически детерминированные процессы роста и развития [11]. Скорость нарастания и размеры листовой поверхности являются одной из важных предпосылок накопления хозяйственно-полезной биомассы и формирования урожая картофеля [12]. Адаптационную способность растений можно оценить по ряду параметров, характеризующих функциональную активность и уровень стресса. Количество пигментов отражает фотосинтетическую способность растений, а их пластичность и адаптивность – устойчивость к факторам среды. Состав клеточных мембран (липидов и белков) характеризует процессы, связанные с переносом веществ через мембраны. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) является одним из первых ответов растений на неблагоприятные воздействия, а содержание компонентов, защищающих клетки от свободных радикалов и процессов окисления, свидетельствуют о балансе клеточных процессов катаболизма и анаболизма [13].

Цель работы состояла в выявлении взаимосвязи морфологических, физиологических и биохимических параметров надземной части растений и урожайности клубней картофеля в условиях засушливого климата. Исследования проводили на опытном участке Самарского НИИСХ – филиала СамНЦ РАН в сезон 2020 г. В работе использовали среднеспелый сорт (с.) Сиверский и среднеранний с. Третьяковка. Климатические условия в исследуемый период были крайне неблагоприятными для роста и развития растений картофеля. Так, в периоды завязывания клубней и нарастания их массы отмечено 16.2 мм осадков при среднем многолетнем значении 76 мм. В первой и второй декадах июля осадков не было, а температура воздуха составила в среднем за декаду 25.1 и 24.9°C соответственно. Высадку клубней проводили во второй декаде мая 2020 г. Растения высаживали в четырех повторностях по 50 клубней каждая и выращивали без орошения в однотипных почвенных условиях. Рост растений оценивали по высоте и приросту надземной части 5 случайных растений каждого сорта. Линейные размеры измеряли в 10 боковых долях листа этих растений. Для биохимических анализов из усредненной массы боковых долей листа составляли навески 0.1–0.5 г в трех повторностях для каждого вида анализа. Пробы листьев отбирали в 7.00 и 14.00 в период активного цветения (июль) и увядания ботвы (август). В растениях определяли содержание хлорофилла (Хл) *a*, Хл *b,* каротиноидов (Кар), количество мембранных (МБ) и водорастворимых белков (ВБ), мембранных (МЛ) и нейтральных (НЛ) липидов, фосфо- (ФЛ) и гликолипидов (ГЛ), уровень ПОЛ и количество пролина (Прл) и выражали в мг/г сухого веса (с.в.) или ммоль/г с.в. в соответствии с описаниями [14, 15]. Расчеты осуществляли по данным одного биологического опыта. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10 (“StatSoft, Inc.”, США). На рисунках приведены средние арифметические значения (M) со стандартной ошибкой (±SE). Сравнение количественных признаков проводилось на основе t-критерия Стьюдента, результаты статистического анализа считались значимыми при $p < 0.05$.

Урожайность с. Сиверский составила 512 г/на растение или 24.4 т/га, что оказалось в 1.6 раза выше, чем у с. Третьяковка. По морфологическим признакам установлено, что растения с. Сиверский отличались большим количеством стеблей и большей скоростью роста надземной массы. Боковые доли листьев с. Сиверский имели большие размеры и число устьиц в единице площади листа (табл. 1).

В утреннее время листья с. Сиверский накапливали в 1.3–1.5 раза больше пигментов, чем с. Третьяковка. К середине дня достоверных различий в содержании пигментов в листьях обоих

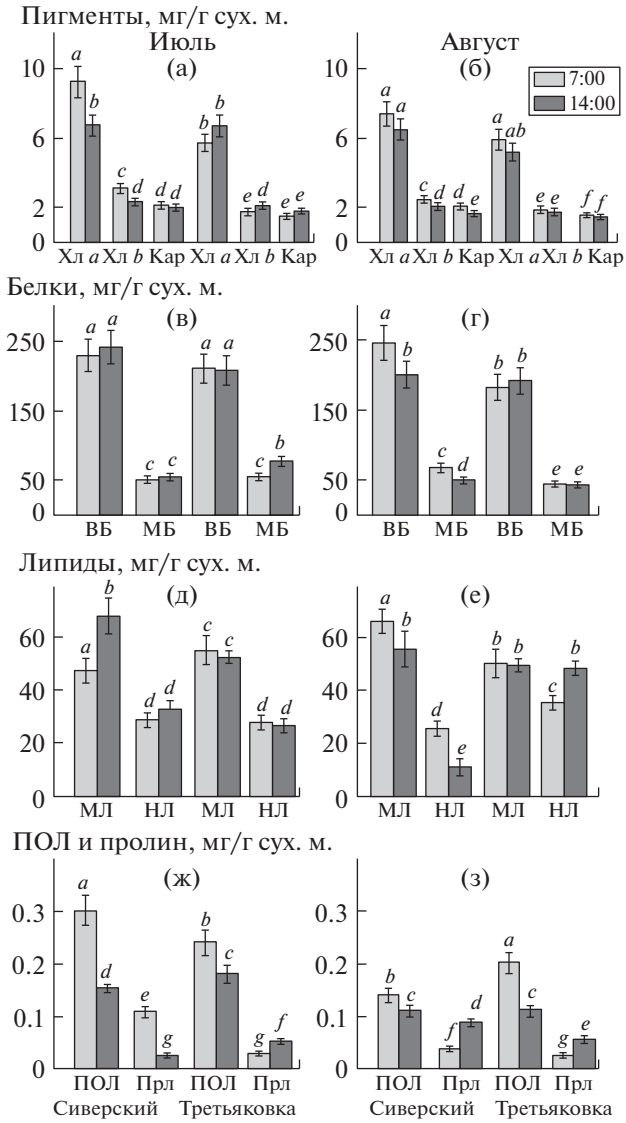

Рис. 1. Биохимические параметры надземной массы картофеля сортов Сиверский и Третьяковка в июле (а, в, д, ж) и августе (б, г, е, з). ВБ – водорастворимые белки, Кар – каротиноиды, МБ – мембранные белки, МЛ – мембранные липиды, НЛ – нейтральные липиды, ПОЛ – перекисное окисление липидов, Прл – пролин, Хл – хлорофилл. M ± SE, *n* (число определений) = 3. Разными буквами обозначены достоверные различия между вариантами опытов при $p < 0.05$.

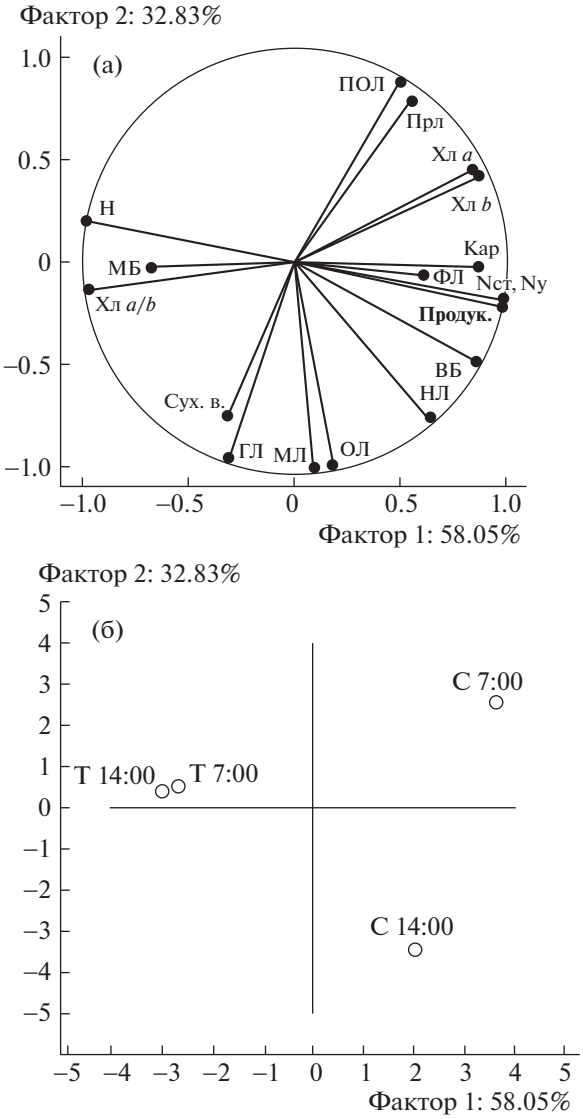

Рис. 2. Анализ взаимосвязи морфологических, физиологических, биохимических показателей и продуктивности сортов картофеля методом PCA (Principal Components Analysis). Общая вариабельность восемнадцати параметров суммирована с помощью первого и второго основных компонентов (фактор 1 и фактор 2) (2а, б). Для сортов Сиверский (С) и Третьяковка (Т) фактор 1 объяснил 58% общих различий, тогда как фактор 2 – 33%. Обозначения: ВБ – водорастворимые белки, ГЛ – гликолипиды; Кар – каротиноиды, МБ – мембранные белки, МЛ – мембранные липиды, НЛ – нейтральные липиды, Н – длина устьиц, ОЛ – общие липиды, ПОЛ – перекисное окисление липидов, Прл – пролин, Продук. – продуктивность, Сух. в. – сухой вес, ФЛ – фосфолипиды, Хл – хлорофилл, Nст – число стеблей, Ny – число устьиц. 7:00 и 14:00 – время суток.

сортов, отобранных в июле, не обнаружено. В период отмирания ботвы у с. Третьяковка содержание пигментов снижалось на 20% (рис. 1 а, б). Общее содержание белка мало различалось между сортами и составляло 295–283 мг/г с.в. в июле и 230–232 мг/г в августе с преобладанием ВБ. Однако в листьях растений с. Сиверский в утреннее время отмечены более высокое содержание белка по сравнению с серединой дня и снижение содержания ВБ по отношению к МБ в августе (рис. 1 в, г). Листья растений с. Сиверский характеризовались также снижением общего содержания липидов в период вегетации за счет снижения количества НЛ, а с. Третьяковка – постоянным количеством суммарных липидов и увеличением НЛ (рис. 1 д, е). Уровень ПОЛ отличался наибольшей изменчиво-

стью значений для обоих сортов. В утреннее время содержание продуктов ПОЛ было выше в 1.5–1.9 раза по сравнению с серединой дня (рис. 1 ж, з). Содержание аминокислоты пролина – активного осмопротектора и антиоксиданта – достоверно выше у с. Сиверский в период отмирания ботвы и в дневное время по сравнению с утренним временем.

Для анализа взаимосвязей между исследованными показателями морфологии, физиологии, биохимии и продуктивности был использован метод PCA (Principal Components Analysis). Для основного набора характеристик было создано 2-х факторное пространство на основе корреляционной матрицы. Фактор 1 описывает 58% общей вариации, фактор 2 – 33% (рис. 2 а). Круг на графике показывает, насколько хорошо каждая переменная воспроизводится текущим набором факторов – чем она ближе к окружности, тем лучше она воспроизведена. Фактор 1 вносит наибольший вклад в разделение двух сортов картофеля, а фактор 2 – в разделение физиолого-биохимического состояния растений в течение дня (рис. 2 б). Однонаправленность векторов свидетельствует о положительной связи параметров, которая тем сильнее, чем ближе векторы находятся друг к другу. Противоположное направление векторов говорит об отрицательной связи, а угол в 90° – о низкой. Так, вектор “Продуктивность” и векторы “Кар”, “ФЛ”, число устьиц “Ny” и стеблей “Nст” имеют одинаковую направленность и близко расположены друг к другу, т.е. хорошо коррелируют между собой ($R > 0.94$). Векторы “ПОЛ” и “Прл” также положительно взаимосвязаны ($R = 0.89$). Векторы “Сух. в.” и “ГЛ” направлены в противоположную сторону от векторов “ПОЛ” и “Прл” ($R = -0.90$ и $R = -0.88$ соответственно).

Проведенные исследования выявили различия морфологических, физиологических и биохимических параметров растений картофеля у высокоурожайного с. Сиверский и низкоурожайного с. Третьяковка. Так, наибольшая взаимосвязь с продуктивностью по данным статистического анализа выявлена для морфологических показателей (число устьиц на единицу площади листа и число стеблей) и биохимических (содержание пигментов, фосфолипидов, нейтральных липидов и водорастворимых белков).

Таким образом, установлено, что как морфологические, так и физиолого-биохимические параметры способны влиять на ход и направленность продукционного процесса и, как следствие, на урожайность определенного сорта.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Комплексного плана научных исследований “Развитие селекции и семеноводства картофеля” и “Изучение механизмов адаптации в регуляции устойчивости ресурсных видов растений в экосистемах в связи с прогнозируемым изменением климата”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха” и авторам сортов Сиверский и Третьяковка за предоставленный для исследований семенной материал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Deuvax A., Kromann P., Ortiz O.* // Potato Res. 2014. V. 57. P. 185–199.
2. *Старовойтов В.И.* Современные технологии возделывания картофеля: состояние, перспективы развития. Картофелеводство в регионах России. Актуальные проблемы науки и практики. М.: ВНИИКХ РЦСК, 2006. С. 45–58.
3. *Brown C.R.* // Potato Res. 2011. V. 54. P. 287–300.
4. *Obidiegwu J.E., Bryan G.J., Jones H.G., Prashar A.* // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 542.
5. Изменение климата, 2014 г.: Обобщающий доклад. Вклад Рабочих групп I, II и III в Пятый оценочный доклад Межправительственной группы экспертов по изменению климата. МГЭИК, Женева, Швейцария, 163 с.
6. *Hijmans R.J.* // Am. J. Potato Res. 2003. V. 80. P. 271–279.
7. *Raymundo R., Asseng S., Robertson R., Petsakos A., Hoogenboom G., Quiroz R., Hareau G., Wolf J.* // Eur. J. Agron. 2018. V. 100. P. 87–98.
8. *Гамалей Ю.В.* // Ботан. журн. 1985. Т. 70. № 10. С. 1302–1313.
9. *Шалпыков К.Т.* // Современные проблемы науки и образования. № 5. 2014. http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14499
10. *Keutgen A.J., Keutgen N., Wszelaczyńska E., Pobereżny J., Milczarek D., Tatarowska B., Flis B.* // Potato Res. 2020. V. 63. P. 75–95.
11. *Табаленкова Г.Н., Головко Т.К.* Продукционный процесс культурных растений в условиях холодного климата. СПб: Наука. 2010. 231 с.
12. *Головко Т.К.* Фотосинтез и дыхание в связи с клубнеобразованием у картофеля. Регуляция роста и развития картофеля. М.: Наука. 1990. С. 13–20.
13. *Розенцвет О.А., Нестеров В.Н., Богданова Е.С.* // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 4. С. 251 – 265.
14. *Rozentsvet O., Nesterov V., Bogdanova E., Kosobryukhov A., Zubova S., Semenova G.* // Plant Physiol. Biochem. 2018. V. 129. P. 213–220.
15. *Rozentsvet O.A., Nesterov V.N., Bogdanova E.S.* // Phytochemistry. 2014. № 105. P. 37–42.

PRODUCTIVITY AND DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL PARAMETERS OF POTATOES UNDER AROID CLIMATE

O. A. Rozentsvet[a,#], E. S. Bogdanova[a], V. N. Nesterov[a], Academician of the RAS S. N. Shevchenko[b], A. L. Bakunov[c], A. V. Milekhin[c], and S. L. Rubtsov[c]

[a] *Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of the Volga Basin RAS, Togliatti, Russian Federation*

[b] *Samara Federal Research Scientific Center RAS, Samara, Russian Federation*

[c] *Samara Federal Research Scientific Center RAS, Samara Scientific Research Agriculture Institute named after N.M. Tulajkov, Bezenchuk, Russian Federation*

[#]*e-mail: olgarozen55@mail.ru*

For the first time the interrelation of parameters of morphology, physiology, biochemistry and productivity of potato plants was shown on the example of a mid-season-ripening variety (v.) Siversky and a mid-early v. Tretyakovka. The yield of the v. Siversky variety turned out to be 1.6 times higher than of the Tretyakovka. Aboveground biomass of the Siversky was distinguished by an increased content of photosynthetic pigments, a greater variability of the protein and lipid metabolism indicators, as well as more intense oxidation processes and antioxidant protection which can be the key to its greater productivity. Multivariate statistical analysis found that in the climatic conditions of central Russia in 2020, the greatest relationship with productivity was revealed for such indicators as the stomata number per unit of the leaf area, the number of stems, the content of pigments, phospholipids, neutral lipids and water-soluble part of the protein. Thus, both morphological and physiological-biochemical properties can influence the course and direction of the production process, and, therefore, the yield of a certain variety.

Keywords: Solanum tuberosum, drought resistance, productivity, proteins, lipids, proline, photosynthetic pigments

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 148–151

УДК 57.034

ПЕРИОДИЧЕСКАЯ “СПОНТАННАЯ” АКТИВНОСТЬ ЖИВОТНЫХ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КВАЗИРИТМИЧЕСКИМ ФАКТОРОМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ?

© 2021 г. М. Е. Диатроптов[1,*], член-корреспондент РАН А. В. Суров[1]

Поступило 09.11.2020 г.
После доработки 23.11.2020 г.
Принято к публикации 25.11.2020 г.

Проведено исследование динамики пения садовой овсянки (*Emberiza hortulana*) и разлета на ночлег стаи скворцов (*Sturnus vulgaris*). Полученные данные были сопоставлены с измеренными параллельно колебаниями температуры тела группы лабораторных мышей. Оправданность таких сопоставлений определялась наличием устойчивой корреляции между показателями ежеминутных изменений температуры тела у лабораторных мышей и зеленушек (*Chloris chloris*). Было показано, что одновременно с повышением температуры тела у мышей наблюдается увеличение частоты пения садовой овсянки. Более того, моменты устройства на ночлег скворцов совпадают с максимумами в динамике ежеминутных изменений температуры тела мышей. Представленные факты указывают на возможное наличие внешнего синхронизатора “спонтанных” колебаний активности и связанных с ними изменений температуры тела, определяющихся, вероятно, тонусом симпатической нервной системы.

Ключевые слова: ритмы активности, температура тела, синхронизаторы, млекопитающие, птицы

DOI: 10.31857/S2686738921020074

Периодические изменения активности животных разных классов известны и изучаются уже давно [1]. В частности, в динамике интенсивности пения дроздовидной камышевки (*Acrocephalus arundinaceus*) выявляется периодическое (в диапазоне 4–20 мин) увеличение продолжительности песни с укорочением времени между ними, чередующееся с периодом, когда песни короче, а временные интервалы между ними длиннее [2]. То есть у этого вида птиц наблюдаются колебания мотивационного состояния к пению, вероятно, определяющиеся уровнем возбуждения птицы. В настоящее время нет ответа на вопрос: являются ли такие колебания в активности животных эндогенными или они вызваны действием факторов внешней среды?

Наличие таких ритмов у таксономически далеких организмов указывает на фундаментальные свойства активности ЦНС. Периодическое изменение ЭЭГ реакции на повторяющиеся одинаковые раздражители объясняются изменением спонтанной активности нервной системы [3, 4]. Также принято считать, что незначительные колебания температуры тела, отражающие колебания активности симпатического и парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, имеют эндогенную природу [5, 6].

Результаты наших исследований показали, что прием пищи скворцов, находящихся на расстоянии до 100 км друг от друга, происходит преимущественно одновременно, что указывает на синхронность мотивационного поведения к приему пищи [7]. Также было показано, что в суммарных спектрах температуры тела у нескольких видов млекопитающих и птиц, различающихся уровнем обмена веществ, в диапазоне 10–120 мин выявляется одинаковый набор основных гармоник, которые проявляются синхронно у разных особей. Следовательно, период колебаний температуры тела не определяется внутренними особенностями организма и, предположительно, отражает влияние внешнего биотропного фактора среды [8].

Целью данной работы является попытка выявить периодические изменения в динамике пения садовой овсянки и разлета на ночлег стаи скворцов и сопоставить их с измеренными параллельно изменениями температуры тела у лабораторных мышей.

В качестве удобного объекта для наблюдения динамики пения была выбрана садовая овсянка, песня у которой представлена отдельными корот-

[1] *ФГБУН “Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН”, Москва, Россия*
**e-mail: diatrom@inbox.ru*

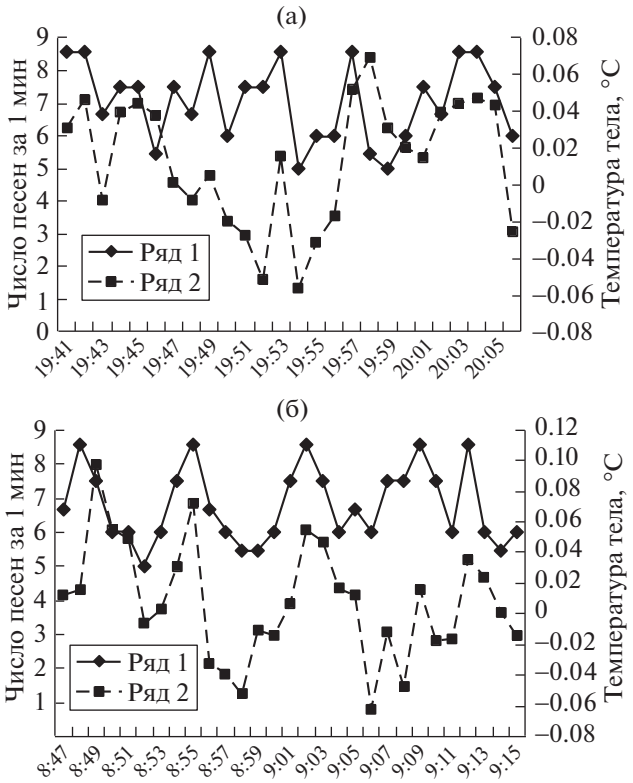

Рис. 1. Примеры динамики интенсивности пения (число трелей в минуту) садовой овсянки (ряд 1) и ежеминутных изменений температуры тела группы мышей (ряд 2). (а) в момент вечернего пения 9 июня (r = 0.41, p = 0.036) и (б) в период утреннего пения 10 июня (r = 0.42, p = 0.02).

Рис. 2. Распределение методом наложения эпох значений продолжительности интервала между трелями в песне садовой овсянки относительно максимальных ежеминутных изменений температуры тела группы мышей (Утро – ряд 1, Вечер – ряд 2). Представлены медианы и интерквартильный размах.

кими трелями. Всего было проанализировано 7 ч пения, полученных от трех разных самцов. Из этого времени 3 ч приходилось на вечер, а 4 ч – на утренние часы. Наблюдения были проведены с 9 по 12 июня 2020 г., когда большинство самцов активно не поют и выкармливают птенцов. Проведение наблюдений в такое время минимизировало возможность возбуждения птицы пением самцов конспецификов.

В качестве параметра для оценки ритмичности “принятия решения” была проанализирована динамика устройства на ночлег стаи обыкновенных скворцов. Наблюдения проводили с 1 по 13 мая 2020 г. в период откладки и насиживания яиц, когда самки ночуют в скворечниках. Всего на участке в 30 соток было развешено и заселено 29 скворечников. Вечером в зависимости от погоды за 30–60 мин до устройства на ночлег скворцы усаживались стаей на ближайших самых высоких деревьях, и оттуда, по несколько особей, периодически, на протяжении 20–40 мин залетали в скворечники. Преимуществом такой регистрации являлось то, что “принятие решения” о залете принималось на фоне спокойного вечернего отдыха птицы. Время залета регистрировали с точностью 1 мин. Наиболее длинные и информативные ряды были получены при ясной безветренной погоде, когда продолжительность вечернего отдыха и интервал между залетом на ночлег первых и последних особей максимальны. Вышеперечисленные исследования проводились в Спасском районе Рязанской области.

Параллельная регистрация динамики температуры тела у лабораторных мышей и обыкновенных зеленушек (*Chloris chloris*) была проведена в период марта-апреля 2020 г. Динамику внутрибрюшинной температуры тела регистрировали с частотой 1 раз в минуту при помощи имплантированных внутрибрюшинно датчиков ДТН3-28 (“ЭМБИ РЕСЕРЧ”, Новосибирск). Внутрибрюшинное внедрение датчиков проводили под золетиловым наркозом (“Virbac Sante Animale”, Франция), вводимым внутримышечно в дозе 7–10 мг/кг. Для лабораторных мышей (n = 7) были созданы условия искусственного постоянного не яркого освещения интенсивностью около 600 лк., а птицы (n = 6) находились при естественном световом режиме. Процедура эксперимента одобрена комиссией по биоэтике ИПЭЭ РАН протокол № 14 от 15.01.2018.

Несмотря на то что анализ индивидуальных ритмов очень важен, для целей настоящей работы мы использовали показатель медианы ежеминутных изменений температуры тела по группе жи-

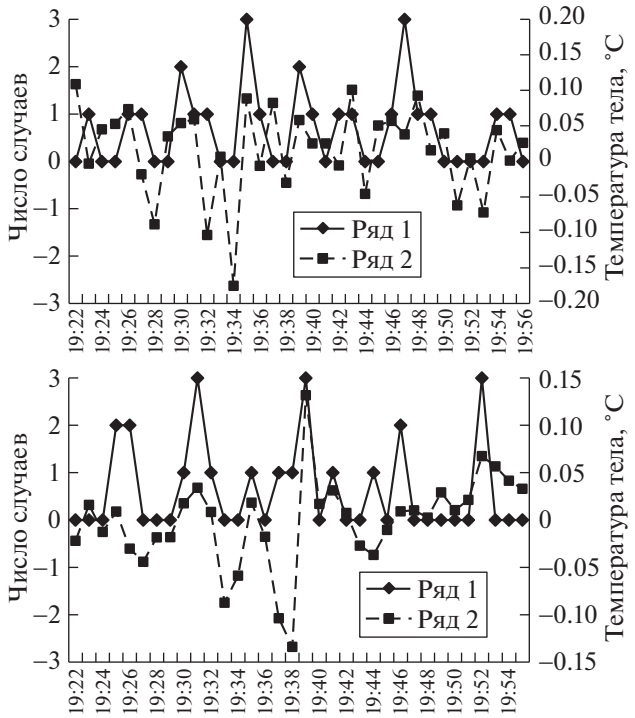

Рис. 3. Динамика устройства на ночлег скворцов (ряд 1) и ежеминутные изменения температуры тела группы мышей (ряд 2). (а) 3 мая – пример 4-минутных колебаний ($r = 0.17$, $p = 0.31$) ; (б) 5 мая – пример 6–8-минутных колебаний ($r = 0.22$, $p = 0.23$).

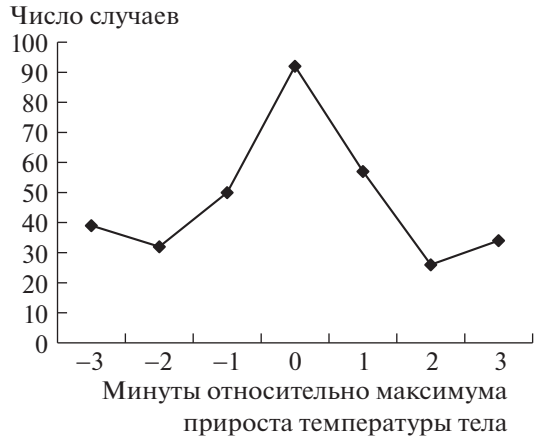

Рис. 4. Распределение методом наложения эпох числа залетов на ночлег скворцов относительно максимумов в динамике ежеминутных изменений температуры тела группы мышей.

вотных, отражающую интегративную реакцию разных особей. Между медианами этих значений по группе мышей и зеленушек показатели корреляции Спирмена в зависимости от календарной даты составляли от 0.08 ($p = 0.01$) до 0.24 ($p = 0.004$). Анализ совпадения экстремумов медианы ежеминутных изменений температуры тела между мышами и зеленушками в диапазоне ритмов с периодом 4–16 мин показал их совпадение с точностью до ±1 мин в 78% случаев. Таким образом, ритмические изменения температуры тела у мышей и птиц наблюдаются синхронно и, вероятно, определяются каким-то квазиритмическим фактором внешней среды.

На рис. 1 приведен пример динамики изменения интенсивности пения садовой овсянки и температуры тела в группе мышей: в зависимости от даты исследования преобладали либо 4-минутные изменения, либо 6–12-минутные. Коэффициент корреляции Спирмена между исследуемыми параметрами был статистически значимым. Также сопоставление интенсивности пения и изменений температуры тела было проведено методом наложенных эпох. Было построено распределение показателя продолжительности интервалов между отдельными трелями овсянки относительно экстремумов ежеминутных изменений температуры тела в группе мышей (рис. 2). Оказалось, что в период экстремума температуры тела мышей продолжительность интервалов между отдельными трелями равна 5–6 сек, тогда как в среднем она колебалась в диапазоне 7–8 сек. Показатели в период максимального увеличения температуры тела (в нулевую минуту) и за 2 мин до и после этого события статистически значимо различаются ($p = 0.0003$ по тесту Манн–Уитни, $z = -3.5$). Следовательно, существует прямая связь между интенсивностью пения птицы, отражающей ее физиологическое состояние, и колебаниями температуры тела.

На рис. 3 представлены примеры параллельной регистрации числа залетевших в скворечник скворцов и ежеминутных изменений температуры мышей: 3 мая преобладала 4-минутная ритмичность, а 5 мая – 6–8-минутная. Коэффициенты корреляции не достигали статистической значимости. Однако распределение всех зарегистрированных залетов в скворечник птиц относительно максимумов медианы ежеминутных изменений температуры тела группы мышей показало их достоверную связь: в период максимума зарегистрировано 92 залета скворцов, а за 2 мин до и после этого только 27–32 случая ($p < 0.001$ по z тесту для оценки двух выборочных долей, $z = 5.99$) (рис. 4). Таким образом, установлена связь между общими для птиц и млекопитающих максимальными значениями ежеминутных изменений температуры тела и “принятием решения” о залете на ночлег скворцов.

Колебания температуры тела в диапазоне 4–16 мин хорошо коррелируют с изменениями геомагнитного поля, однако существует и ряд других физических факторов, имеющих в своих спектрах те же частоты [8, 9]. Природа внешнего синхро-

низатора пока остается неизвестной. На основании представленных результатов можно предполагать, что такие формы “спонтанной” активности птиц, как изменения интенсивности пения и “принятие решения” о залете на ночлег в скворечник, не случайны во времени, а связаны с периодическими колебаниями температуры тела в диапазоне 4–16 мин, которые, в свою очередь, определяются активацией симпатической нервной системы и, вероятно, имеют внешние синхронизаторы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ИПЭЭ РАН “Экологические и эволюционные аспекты поведения и коммуникации животных” АААА-А18-118042690110-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Непомнящих В.А.* // Журн. общ. биологии. 2012. Т. 73. № 4. С. 243–252.
2. *Непомнящих В.А., Опаев А.С.* // Доклады Академии наук. 2014. Т. 454. № 2. С. 241–243. https://doi.org/10.7868/S0869565214020285
3. *Monto S., Palva S., Voipio J., Palva J.M.* // J. Neurosci. 2008. V. 28. 33. P. 8268–8272. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1910-08.200
4. *Crevecoeur F., Bollens B., Detrembleur C., Lejeune T.M.* // J. Neurosci. Methods. 2010. V. 192. № 3. P. 163–172. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.017
5. *Braulke L.J., Heldmaier G.* // Cryobiology. 2010. V. 60. № 2. P. 198–203. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.11.001
6. *Blessing W., Ootsuka Y.* // Temperature (Austin). 2016. V. 3. № 3. P. 371–383. https://doi.org/10.1080/23328940.2016.1177159
7. *Диатроптов М.Е., Рутовская М.В., Суров А.В.* // Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 492. № 1. С. 267–271. https://doi.org/10.31857/S2686738920030038
8. *Диатроптов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С.* // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2020, Т. 169. № 6. С. 706–711.
9. *Леонович А.С., Мазур В.А.* // Солнечно-земная физика. 2005. Вып. 8. С. 99–100.

IS PERIODIC “SPONTANEOUS” ACTIVITY OF ANIMALS IS DETERMINED BY A QUASI-RHYTHMIC FACTOR OF THE EXTERNAL ENVIRONMENT?

M. E. Diatroptov[a,#] and Corresponding Member of the RAS A. V. Surov[a]

[a] *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: diatrom@inbox.ru*

We have studied the dynamics of the singing of garden bunting (*Emberiza hortulana*) and the dispersal of a flock of starlings (*Sturnus vulgaris*) for the night rest. The data obtained were compared with the body temperature fluctuations, which were measured in parallel in a group of laboratory mice. The validity of such comparisons was determined by the presence of a stable correlation between the indicators of minute changes in body temperature in mice and greenfinches (*Chloris chloris*). It was shown that simultaneously with the increase in body temperature in mice, there is an increase in the frequency of chanting of garden buntings. Moreover, the exact moments of the starlings' flies into the birdhouse for the night coincide with the maxima in the dynamics of minute changes in body temperature of mice. These facts indicate the possible presence of an external synchronizer of “spontaneous” fluctuations in activity and associated changes in body temperature, which are probably determined by the tone of the sympathetic nervous system.

Keywords: rhythms of activity, body temperature, synchronizers, mammals, birds

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 152–155

УДК 591.582.2:598.8

СИНХРОННОЕ ПЕНИЕ ПТИЦ, СЛУЧАЙНОЕ СОВПАДЕНИЕ ИЛИ АКУСТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

© 2021 г. М. Я. Горецкая[1,*], С. В. Огурцов[1], М. А. Сёмина[1], П. А. Козлова[1], В. Д. Салова[1], П. О. Калитина[1], Д. Б. Бурыкин[2], И. Р. Бёме[1]

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым
Поступило 23.12.2020 г.
После доработки 31.12.2020 г.
Принято к публикации 03.01.2021 г.

Одновременное пение может свидетельствовать как о наличии коммуникативного взаимодействия между птицами, так и быть случайным совпадением. Была разработана программа, позволяющая математически моделировать независимое пение птиц с заданным уровнем акустической активности. Это дало нам возможность статистически оценить, является ли синхронное пение случайным или свидетельствует о наличии акустических взаимодействий между птицами. При автоматической регистрации пения (Song Meter SM4) выявлены случаи достоверных акустических взаимодействий между особями как одного, так и разных видов. Их доля составляет 6% от общего времени пения. Наиболее многочисленные и активно поющие зяблики (при пении нескольких особей) подавляют пение других видов. Пение одиночного зяблика, напротив, может провоцировать пение других видов, вовлекая в песенные дуэли до этого молчащих соседей. Возможно, в конце сезона размножения именно акустические взаимодействия ответственны за поддержание структуры поселения.

Ключевые слова: одновременное пение, воробьинообразные, акустические взаимодействия, моделирование, *Fringilla coelebs*

DOI: 10.31857/S2686738921020098

У воробьиных птиц одним из основных способов передачи информации является пение. Изменение структуры или типа песни часто является агрессивным сигналом для оппонента [1]. Кроме того, птицы могут реагировать на пение соседа, изменяя активность и ритм пения, в том числе петь одновременно с ним, такое пение многими авторами рассматривается как провокация драки [2]. У части видов обнаружено намеренное избегание одновременного пения с особями своего и другого вида [3–7]. Пение одновременно с соседом и/или сразу за ним, независимо от изменений структуры песен, может свидетельствовать либо о наличии коммуникативного взаимодействия между птицами, либо являться случайным совпадением ритмики и активности пения нескольких особей [8–11].

Целью нашей работы было изучить случаи одновременного пения как одного, так и разных видов птиц и определить, являются ли они простыми совпадениями или акустическими взаимодействиями.

Пение птиц было записано в течение двух суток с 20 по 23 июня 2019 г., двумя автоматическими регистраторами Song Meter SM4, которые висели в каждой из 4 выбранных точек в смешанном лесу Солнечногорского р-на Московской обл. Приборы работали круглосуточно, чередуя 30 мин регистрации и 30 мин перерыва. Всего проанализировано 48 ч записей. Для оценки общего уровня активности пения в поселении, в каждой записи считали количество спетых песен каждого вида. Пение считали активным, если число песен за 30 мин превышало или равнялось 100.

Нами была разработана программа, позволяющая математически моделировать случайное пение птиц с заданным уровнем активности и статистически оценивать отклонение частоты совпадения эпизодов пения двух птиц в природе от случайного уровня. Мы использовали модель случайного процесса, созданную на основе автоматизированных формул в программе MS Excel 2003. В модели на основе равномерного распределения генерировали два ряда по 30 случайных чисел (5 секундных интервала), каждое из которых равнялось либо 0 (не поет), либо 1 (поет), и оценивали, с какой частотой имело место совпадение

[1] *Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[2] *Экопарк "Начинание", Солнечногорский р-н МО, Россия*
**e-mail: m.goretskaia@gmail.com*

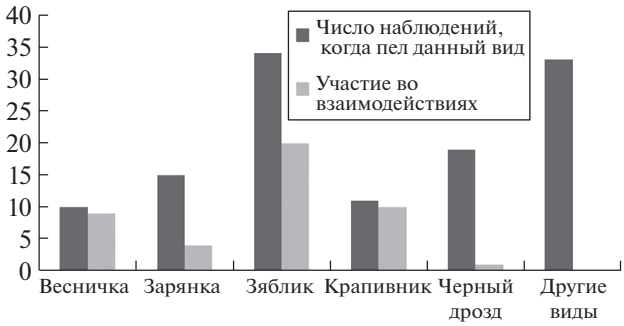

Рис. 1. Активно поющие виды и их участие в акустических взаимодействиях.

Рис. 2. Доля внутривидовых и межвидовых акустических взаимодействий.

единиц в двух рядах. Мы имели возможность изменять активность пения птиц в рамках модели от 1 до 12 песен в минуту (что соответствовало от 2 до 30 раз случаев "пения" за 30 интервалов). Процедуру генерации случайных чисел для "пары поющих птиц" повторяли 5000 раз. В результате получали ряд частот совпадений случаев "пения" птиц. Для этого ряда вычисляли 2.5% и 97.5% квантили, выбрав для последующего статистического анализа двустороннюю гипотезу с 5%-уровнем значимости.

В 30 мин записи реального пения мы выбирали периоды, в которые происходило одновременное пение двух особей. В эти периоды подсчитывали число 5-секундных интервалов, в которых имело место совместное пение. Также учитывали активность пения участников в данный интервал времени. Наши предварительные данные показали, что особи, поющие синхронно, редко поддерживают такой стиль пения дольше, чем 2–3 мин [8]. Для анализа мы выбирали виды, длительность песни которых сопоставима с 5 сек. Далее мы сравнивали частоту встречаемости совместного пения с вычисленными квантилями. Если частота одновременного пения птиц укладывалась в интервал между полученными квантилями, то совпадение в пении считали случайным ($p > 0.05$). Если частота одновременного пения превышала 97.5%-квантиль (при максимальной активности пения – 40% совпадений), то совпадение в пении считали статистически значимыми т.е. между птицами имело место акустическое взаимодействие. Мы не исследовали случаи намеренного избегания синхронного пения, так как в записях анализировали только те фрагменты, где птицы пели одновременно. Поэтому мы не выявили ни одного статистически достоверного случая намеренного избегания.

За 48 ч наблюдений было выявлено 22 случая статистически значимых ($p < 0.05$) акустических взаимодействий, а не случайных совпадений ритмов и активности пения. Они составляли 6% от общего времени пения. Были отмечены внутривидовые взаимодействия между зябликами (*Fringilla coelebs*), пеночками-весничками (*Phylloscopus trochilus*) и зарянками (*Erithacus rubecula*). Межвидовые акустические взаимодействия были отмечены, преимущественно, между зябликами и другими видами (пеночкой-весничкой и крапивником (*Troglodytes troglodytes*)). Между разными видами также были обнаружены акустические взаимодействия (пеночка-весничка и зарянка, пеночка-весничка и крапивник, и зарянка и черный дрозд *Turdus merula*) (рис. 1). Среди всех акустических взаимодействий наибольшую долю занимали взаимодействия между зябликом и другими видами (рис. 2).

В большинстве наблюдений было отмечено пение зябликов, у них же было обнаружено и большее количество особей, участвующих в акустических взаимодействиях. Пение пеночки-веснички и крапивника наблюдали практически только во время акустических контактов (рис. 1). Вокальные взаимодействия происходили, как правило, между активно поющими птицами (из 20 случаев активного пения птиц в 10 были выявлены акустические контакты, а из 11 случаев неактивного пения, только в двух) (различия достоверны по $\chi^2 = 70$, $p < 0.0001$). Нами выявлена положительная связь между наличием акустических взаимодействий между зябликами и активностью пения зябликов ($R = 0.42$, $p = 0.02$, ранговая корреляция по Спирмену) и отрицательная связь между активностью пения зябликов и пением других видов птиц ($R = -0.65$, $p < 0.001$, ранговая корреляция по Спирмену) (рис. 3).

Также выявлена положительная связь между акустическими взаимодействиями между зябликами и другими видами и активностью пения других видов ($R = 0.45$, $p = 0.01$, ранговая корреляция по Спирмену).

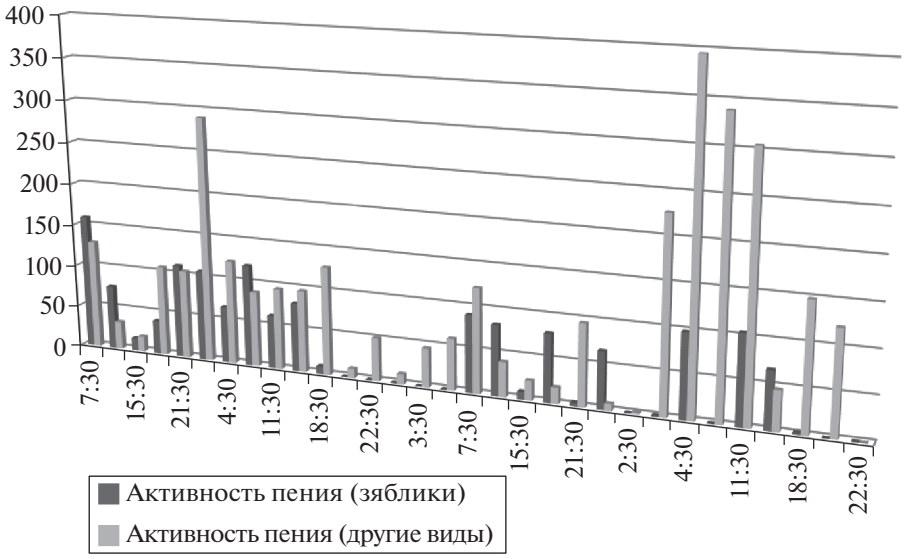

Рис. 3. Влияние пения зяблика на вокальную активность других видов птиц.

Таким образом, при автоматической регистрации пения птиц нами выявлены случаи достоверных акустических взаимодействий между особями как одного, так и разных видов. Их доля составляет 6% от общего времени пения. Наша работа проводилась ближе к концу сезона размножения, когда многие виды снижают вокальную активность. Акустические взаимодействия происходят во время активного пения птиц, и, возможно, участие в песенных дуэлях провоцирует пение особей разных видов. Наиболее многочисленные и активно поющие зяблики (при пении нескольких особей) подавляют пение других видов (рис. 3). Пение одного зяблика, видимо, может провоцировать пение других видов, вовлекая в песенные дуэли до этого молчащих соседей, т.е. зяблики являются организаторами вокальной активности всего поселения. Возможно, в конце сезона размножения именно акустические взаимодействия ответственны за поддержание структуры поселения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны руководству экопарка “Начинание” за предоставление оборудования для проведения записей и за возможность работы на территории экопарка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Беме И.Р., Горецкая М.Я.* Песни птиц//Москва.: КМК. 2013. 78 с.
2. *Bradbury J.W., Vehrencamp S.L.* Principles of Animal Communication (2nd edition). Sunderland M A: Sinauer Associates: Companion. 2011. 697 pp.
3. *Cody M.L., Brown J.H.* Song asynchrony in neighbouring bird species. // Nature.1969. V. 222. № 24. P. 779–780. https://doi.org/10.1038/222778b
4. *Ficken R.W., Ficken M.S., Hailman J.P.* Temporal pattern shifts to avoid acoustic interference in singing birds. // Science. 1974. V. 183. № 4126. P. 762–763. https://doi.org/10.1126/science.183.4126.762
5. *Wasserman F.E.* Intraspecific acoustical interference in the white-throated sparrow. // Animal Behaviour. 1977. V. 25. № 4. P. 949–952. https://doi.org/10.1016/0003-3472(77)90045-8
6. *Hultsch H., Todt D.* Temporal performance roles during vocal interactions in nightingales (*Luscinia megarhynchos* B.) // Behaviour Ecology Sociobiology. 1982. V. 11. № 4. P. 253–260. https://doi.org/10.1007/BF00299302
7. *Popp J.W., Ficken R.W., Reinartz J.A.* Short-term temporal avoidance of interspecific acoustic interfference among forest bird. // The Auk. 1985. V. 102. № 4. P. 744–748. https://doi.org/10.2307/4086830
8. *Корбут В.В., Горецкая М.Я.* Акустическая активность и ритмическая организация пения у некоторых видов воробьиных птиц (Passeriformes, Fringillidae, Sylviidae). // Доклады Академии наук. 1998. Т. 359. № 4. С. 569–571.
9. *Иваницкий В.В.* Кто дирижирует ансамблем певчих птиц?// Природа. 2002. № 6. С. 30–39.
10. *Горецкая М.Я., Зайцева Н.А.* Способы изучения акустических взаимодействий у воробьиных птиц (ритмика, активность, структура песни). // Развитие современной орнитологии в Северной Евразии. 2007. Ставрополь.: Из-во Ставропольского университета. С. 635–647.
11. *Masco C., Allesina S., Mennill D.J., et al.* The song overlap null model generator (SONG): A new tool for distinguishing between random and non-random song overlap. // Bioacoustics. 2015. V. 25. P. 29–40. https://doi.org/10.1080/09524622.2015.1079734

BIRDSONG OVERLAPPING, RANDOM COINCIDENCE OR ACOUSTIC INTERACTIONS

M. Goretskaia[a,#], S. Ogurtsov[a], M. Syomina[a], P. Kozlova[a], V. Salova[a], P. Kalitina[a], D. Burygin[b], and I. Beme[a]

[a] *M.V. Lomonosov Moscow State University, Biological faculty, Moscow, Russian Federation*

[b] *The Nachinanie Ecopark, Solnechnogorskii district, Moscow oblast, Russian Federation*

[#]*e-mail: m.goretskaia@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

Passerine birdsong overlapping may indicate the presence of communicative interaction between birds or be a simple coincidence. We developed a program that allows us to modulate the independent singing of birds with a given level of song rate, and to statistically evaluate whether song overlapping is a random coincidence or real acoustic interactions between birds. Analysis of automatic registration of singing (Song Meter SM4), allow us to find out the cases of reliable acoustic interactions between individuals, both of conspecific and heterospecific, which made up a share of 6% of the total singing time. The most numerous and actively singing chaffinches suppress the singing of other species. Singing of a solitary chaffinch, on the contrary, can provoke the singing of other species, involving previously silent neighbors in song duels. Possibly, at the end of the breeding season, it is the acoustic interactions that are responsible for maintaining the structure of the multispecies community.

Keywords: song overlapping, passerine, acoustic interaction, modeling, *Fringilla coelebs*

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 156–159

УДК 615.017

АНГИОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ АНКСИОЛИТИКА ФАБОМОТИЗОЛА

© 2021 г. С. А. Крыжановский[1,*], Т. А. Антипова[1], М. Б. Вититнова[1], С. В. Николаев[1], член корреспондент РАН А. Д. Дурнев[1]

Поступило 17.07.2020 г.
После доработки 05.11.2020 г.
Принято к публикации 09.11.2020 г.

В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток эндотелия человека HUVEC, показано, что анксиолитик фабомотизол, который, помимо собственно анксиолитической, обладает нейропротектерной и кардиопротективной активностью, которую во многом связывают с его агонистическим влиянием на сигма-1 рецепторы, проявляет выраженную ангиогенную активность. Ангиогенная активность фабомотизола реализуется в диапазоне концентраций от 10^{-5} М до 10^{-8} М и носит дозозависимый характер. В литературе данных о наличии у агонистов сигма-рецепторов ангиогенной активности ранее представлено не было.

Ключевые слова: фабомотизол, клетки эндотелия человека HUVEC, ангиогенез, сигма-1 рецепторы, цитопротекция

DOI: 10.31857/S2686738921020165

Анксиолитик фабомотизол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид, син. афобазол), синтезирован и фармакологически изучен в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова под руководством академика РАН С.Б. Середенина. В основе анксиолитического действия фабомотизола лежит его способность восстанавливать связывание в бензодиазепиновом участке $ГАМК_A$-рецептора, нарушенное вследствие стресс-индуцированных воздействий [1]. Поскольку фабомотизол сам не связывается с $ГАМК_A$-рецепторным комплексом, восстановление функциональной активности рецептора опосредуется взаимодействием препарата с рядом биологических мишеней.

Показано, что фабомотизол обладает довольно высоким аффинитетом к мелатониновым M_1-рецепторам (Ki = 1.4 × 10^{-5} М), мелатониновым M_3-рецепторам (Ki = 9.7 × 10^{-7} М), рецепторному участку моноаминооксидазы А (МАО-А) (Ki = = 3.6 × 10^{-6} М) и к сигма-1 рецепторам (Ki = 5.9 × × 10^{-6} М) [2]. Помимо анксиолитической, фабомотизол обладает выраженной антимутагенной [3] и цитопротектерной, в частности нейропротектерной [4, 5] и кардиопротективной [6] активностью. Нейропротекторную активность препарата изначально связывали с его агонистическим влиянием на сигма-1 рецепторы (σ_1-R) [4, 5]. Однако позднее было показано, что она обусловлена агонистическим влиянием препарата как на σ_1-R, так и на σ_2-R [7]. Исходя из имеющихся данных, кардиопротективная активность препарата реализуется путем активации σ_1-R, поскольку в настоящее время отсутствуют какие-либо убедительные данные об экспрессии в кардиомицитах σ_2-R. Если механизмы, посредством которых агонисты σ-R реализуют свою нейро- и кардиопротективную активность, в определенной мере известны [8, 9], то вклад σ-R в физиологию и патологию сосудистого русла практически не изучен, имеется лишь несколько сообщений о наличии у агонистов σ-R NO-обусловленной вазодилатирующей активности [10]. Данные о наличии/отсутствии у агонистов σ-R ангиогенной активности в литературе отсутствуют.

Оценку ангиогенной активности фабомотизола проводили в экспериментах *in vitro* на культуре клеток эндотелия человека HUVEC.

Клетки эндотелия HUVEC рассаживали в среде ДМЕМ (HyClone, США), содержащей 20 мМ Hepes (ICN, Германия), 2 мМ L-глутамина (ICN, Германия), гепарин (5 Ед/мл) (Панфарма, Германия), ECGF (20 мкг/мл) (Sigma, США), 10% FBS (Gibco, США) с плотностью 4.0 тыс. на 96-луночные планшеты, покрытые 0.1% желатином (БиолоТ, Россия). Фабомотизол (диапазон концентраций 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} и 10^{-8} М) вносили через 30 мин после рассеивания клеток на планшеты и

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова", Москва, Россия*
**e-mail: sak-538@yandex.ru*

Таблица 1. Суммарная длина микротрубочек в культуре клеток сосудистого эндотелия (HUVEC) после внесения фабомотизола в различных концентрациях

Группа	Суммарная длина микротрубочек, мкм		
	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль
Контроль	209	408	596
Фабомотизол, 10^{-5} М	380	596*	832
Фабомотизол, 10^{-6} М	578	729*	997
Фабомотизол, 10^{-7} М	418	575*	762
Фабомотизол, 10^{-8} М	321	523*	818

Примечание – уровень значимости отличий от контроля: * – $p \leq 0.05$. Критерий Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну.

затем каждые 48 ч (всего 3 внесения). Через 24 ч после последнего внесения фабомотизола клетки фотографировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Nikon, Япония) в фазовом контрасте при увеличении ×100. Длину микротрубочек измеряли в 5 полях зрения каждой лунки с использованием программы WCIF ImageJ и выражали в микрометрах.

Полученные данные обрабатывали с помощью методов математической статистики. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Лилиефорса. Так как распределение полученных данных значительно отличалось от нормального, статистическую значимость различий между выборками определяли с помощью непараметрического аналога однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Полученные данные представляли виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Критический уровень значимости $\alpha = 0.05$.

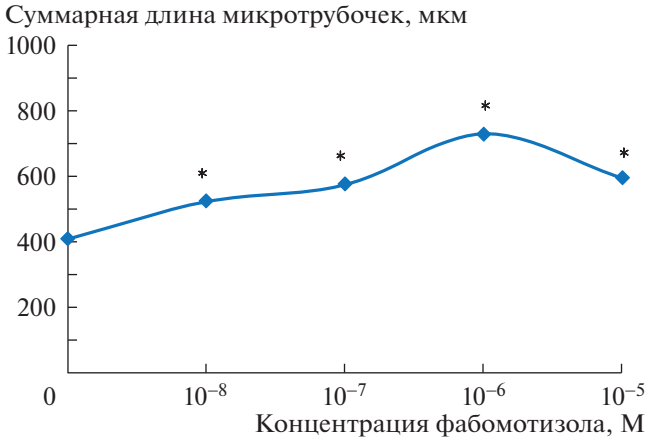

Рис. 1. Суммарная длина микротрубочек в культуре клеток HUVEC после внесения фабомотизола в различных концентрациях.

Как следует из полученных данных, фабомотизол во всех использованных концентрациях стимулирует ангиогенез, о чем свидетельствует статистически значимое ($p \leq 0.05$) увеличение суммарной длины микротрубочек (табл. 1). Наибольший ангиогенный эффект фабомотизол оказывал в концентрации 10^{-6} М. В этом случае длина микротрубочек увеличилась с 408 мкм до 729 мкм, т.е. практически на 80%. Ангиогенное действие препарата носит классический куполообразный дозозависимый характер с минимальной точкой при концентрации фабомотизола в 10^{-8} М и максимальной – 10^{-6} М (рис. 1).

Хорошо известно, что при многих заболеваниях головного мозга и сердца ангиогенез или подавляется, или недостаточно эффективен, в силу чего изучение механизмов и способов регуляции ангиогенеза как инструмента терапевтического ремоделирования недостаточного неоангиогенеза имеет стратегически важное значение, особенно в тех случаях, когда применение высокоэффективных хирургических и/или эндоваскулярных методов лечения или невозможно, или сопряжено с высоким риском развития тяжелых осложнений. Такой подход к лечению ишемических состояний получил название “терапевтический ангиогенез” или “биологическое шунтирование” [11, 12 и др.]. В основе этого направления лежит поиск лекарственных средств, преимущественно биоподобных препаратов, аналогов эндогенных стимуляторов ангиогенеза, обладающих способностью усиливать естественные, но недостаточные в критических ситуациях, процессы неоваскуляризации тканей [13, 14]. Как правило, оригинальные химические соединения не биоподобной структуры в качестве потенциальных стимуляторов неоангиогенеза не рассматриваются, в силу чего наличие у фабомотизола, препарата не биоподобной структуры, выраженной ангиогенной активности может носить не только практическое, но и фундаментальное значение.

Как уже было отмечено выше, в настоящее время отсутствуют данные о наличии у агонистов σ-R ангиогенной активности. В литературе представлена единственная публикация, свидетельствующая о том, что метаболит (±) галоперидола – II valproate ester [(±)-MRJF22], который является неселективным антагонистом σ_1-R и σ_2-R, подавляет ангиогенез в микрососудах сетчатки глаза [15], что позволило авторам этой статьи высказать предположение о том, что антиангиогенное действие метаболита может реализоваться путем блокады σ-R. Исходя из этого, поскольку для фабомотизола показано агонистическое влияние в отношении σ-R, можно полагать, что именно с этим в той или иной мере связана его ангиогенная активность. Также есть все основания полагать, что в нейро- и кардиопротективное [6, 7] действие фабомотизола, реализующееся в условиях систематической экспериментальной терапии, может вносить вклад его способность стимулировать неоангиогенез в ишемизированной ткани.

Изучение механизмов, лежащих в основе этого эффекта фабомотизола, – это предмет дальнейших скрупулезных исследований, особенно с учетом того, что поскольку σ1-R рассматривают как уникальный эволюционный комплекс, обладающий шаперонной активностью, нельзя исключить, что ангиогенная активность агонистов σ1-R может быть и не связана с известными механизмами, ответственными за стимуляцию ангиогенеза. Только после этих исследований можно будет ответить на вопрос, посредством стимуляции каких индукторов ангиогенеза реализуется этот вид активности агонистов σ1-R.

Таким образом, нами впервые показано, что лиганд σ-R анксиолитик фабомотизол обладает значимой ангиогенной активностью. В литературе данных о наличии у агонистов σ-R ангиогенной активности ранее представлено не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г., и др.* Фармакогенетическая концепция анксиоселективного эффекта // Вестник РАМН. 1998. № 11. С. 3–9.
2. *Середенин С.Б., Воронин М.В.* Нейрорецепторные механизмы действия афобазола // Эксп. и клин. фармакология. 2009. Т. 1. № 72. С. 3–11.
3. *Durnev A.D., Zhanataev A.K., Shreder O.V., Seredenin S.B.* Antimutagenic and antiteratogenic properties of afobazole // Ekspp. Klin. Farmakol. 2009. V. 72. № 1. P. 46–51.
4. *Zenina T.A., Gavrish I.V., Melkumyan D.S., et al.* Neuroprotective properties of afobazol in vitro // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. V. 140. № 2. P. 194–196. https://doi.org/10.1007/s10517-005-0443-7
5. *Cuevas J., Behensky A., Deng W., Katnik C.* Afobazole modulates neuronal response to ischemia and acidosis via activation of sigma-1 receptors // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. V. 339. № 1. P. 152–160. https://doi.org/10.1124/jpet.111.182774
6. *Середенин С.Б., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., и др.* К механизму противоишемического действия афобазола // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 6. С. 723–727.
7. *Katnik C., Garcia A., Behensky A.A., et al.* Activation of σ1 and σ2 receptors by afobazole increases glial cell survival and prevents glial cell activation and nitrosative stress after ischemic stroke // J. Neurochem. 2016. V. 139. № 3. P. 497–509. https://doi.org/10.1111/jnc.13756
8. *Середенин С.Б., Воронин М.В., Абрамова Е.В.* Сигма-1 рецепторы – новая мишень фармакологической регуляции // Эксперим. и клин. фарм. 2017. Т. 80. № 9. С. 9–19.
9. *Lewis R., Li J., McCormick P.J., L-H Huang C., Jeevaratnam K.* Is the sigma-1 receptor a potential pharmacological target for cardiac pathologies? A systematic review // Int. J. Cardiol. Heart. Vasc. 2019. V. 26. 100449. https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2019.100449
10. *Trujillo A.N., Katnik C., Cuevas J., et al.* Modulation of mesenteric collecting lymphatic contractions by σ_1-receptor activation and nitric oxide production // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2017. V. 313. P. 839–853. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00702.2016
11. *Парфенова Е.В., Ткачук В.А.* Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы. // Кардиологический вестник. 2007. Т. II (XIV). № 2. С. 5–15.
12. *Veith A.P., Henderson K., Spencer A., et al.* Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2019. V. 146. P. 97–125. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.010
13. *Макаревич П.И., Рубина К.А., Дыйканов Д.Т. и др.* Терапевтический ангиогенез с применением факторов роста: современное состояние и перспективы развития // Кардиология. 2015. Т. 59. № 9. С. 59–71.
14. *Wang J., Fu X., Yu L., Li N., et al.* Preconditioning with VEGF enhances angiogenic and neuroprotective effects of bone marrow mononuclear cell transplantation in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion // Mol. Neurobiol. 2016. V. 53. № 9. P. 6057–6068. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9512-8
15. *Olivieri M., Amata E., Vinciguerra S., et al.* Antiangiogenic effect of (±)-haloperidol metabolite II valproate ester [(±)-MRJF22] in human microvascular retinal endothelial cells // J. Med. Chem. 2016. V. 59. № 21. P. 9960–9966. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01039

ANGIOGENIC EFFECTS OF ANXIOLYTIC FABOMOTIZOLE

S. A. Kryzhanovskii[a,#], T. A. Antipova[a], M. B. Vititnova[a], S. V. Nikolaev[a], and Corresponding Member of the RAS A. D. Durnev[a]

[a] *Federal State Budgetary Institution "Research Zakusov Institute of Pharmacology" (FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology"), Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: sak-538@yandex.ru*

In vitro experiments performed on an isolated human endothelial HUVEC cell culture showed that the anxiolytic fabomotizole, which, in addition to the anxiolytic effect, has neuroprotective and cardioprotective activities largely associated with its agonistic action on sigma-1 receptors and shows a pronounced angiogenic activity. Fabomotizole angiogenic activity is realized in the range concentration from 10^{-5} M to 10^{-8} M and is doze-dependent. In the literature, data on the presence of angiogenic activity in sigma receptor agonists have not been previously reported.

Keywords: fabomotizole, human endothelial cells HUVEC, angiogenesis, sigma-1 receptors, cytoprotection

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 160–164

УДК 616.34-006.6-074:612.017.1

ФАКТОРЫ ИММУНОСУПРЕССИИ PD-1, PD-L1, IDO1 И КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК

© 2021 г. О. В. Ковалева[1,*], М. А. Рашидова[1], А. Н. Грачев[1], В. В. Масленников[1], И. В. Булычева[1], Е. С. Герштейн[1], Е. А. Короткова[1], Н. Ю. Соколов[1], З. З. Мамедли[1], академик РАН Н. Е. Кушлинский[1]

Поступило 05.10.2020 г.
После доработки 16.10.2020 г.
Принято к публикации 17.10.2020 г.

В связи с низкой эффективностью иммунотерапии колоректального рака (КРР) крайне перспективным и актуальным является изучение механизмов иммуносупрессии. В данной работе впервые проведено комплексное исследование экспрессии растворимых и тканевых форм PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови и опухолях больных КРР, а также IDO1 в опухолях. Определена диагностическая и прогностическая значимость исследованных показателей. Выявлены статистически значимое снижение содержания растворимых форм PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови и ассоциация количества PD-L1+ клеток в строме опухолей со стадией КРР. Показано отсутствие корреляций между растворимыми и тканевыми формами исследуемых белков, указывающее на наличие независимых механизмов иммуносупрессии при КРР, что может объяснять неэффективность иммунотерапии данного типа опухолей.

Ключевые слова: колоректальный рак, сыворотка крови, экспрессия, PD-1, PD-L1, IDO1

DOI: 10.31857/S2686738921020153

Важной особенностью развития злокачественной опухоли считают ее уход от иммунологического надзора, что способствует его прогрессированию заболевания. Опухолевые клетки и инфильтрирующие иммунные клетки продуцируют факторы, которые модифицируют микроокружение, придавая ему иммуносупрессивный фенотип. Одними из основных факторов, опосредующих иммуносупрессию, являются PD-1, PD-L1 и IDO1. PD-1 – мембранный рецептор I типа, принадлежащий к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток и экспрессирующийся на их поверхности. PD-L1 (B7-H1, CD274) [1] и PD-L2 (B7-DC, CD273) [2] – основные лиганды рецептора PD-1. Активация ключевой точки PD-1/PD-L1 стимулирует апоптоз антиген-специфичных Т-лимфоцитов и подавляет апоптоз регуляторных супрессорных Т-клеток, что является одним из механизмов иммуносупрессии опухоли [3]. IDO1 (indoleamine-2,3-dioxygenase) – фермент, активация которого приводит к деградации L-триптофана (Trp) с образованием *N*-формилкинуренина [4], а далее целого ряда продуктов, что спо-

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики больных КРР

Характеристика	Всего
Возраст	
≤60	30 (35%)
>60	55 (65%)
Пол	
мужской	46 (54%)
женский	39 (46%)
Стадия	
I–II	57 (67%)
III–IV	28 (33%)
T – размер опухоли	
T1-2	27 (32%)
T3-4	58 (42%)
N – регионарные метастазы	
N–	62 (73%)
N+	23 (27%)
M – отдаленные метастазы	
M–	73 (86%)
M+	12 (14%)
Дифференцировка опухоли	
G1	21 (25%)
G2/3	64 (75%)
Локализация опухоли	
прямая кишка	31 (36%)
слепая и ободочная кишка	54 (64%)

[1] *ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва, Россия*

**e-mail: ovkovaleva@gmail.com*

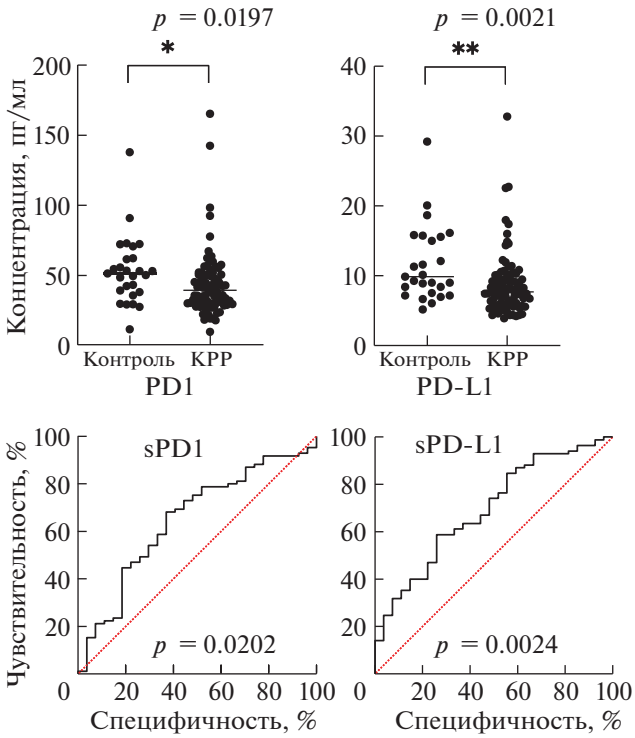

Рис. 1. 1) Сравнительный анализ уровня экспрессии sPD-1 и sPD-L1 у больных КРР и здоровых доноров. 2) ROC-анализ для sPD1 и sPD-L1 у больных КРР: площадь под ROC-кривой составляет 0.694 (69%) для sPD-L1 и 0.649 (64%) для sPD1.

собствует гибели эффекторных Т-клеток и привлечению Т-клеток регуляторного фенотипа [5, 6].

Целью данной работы было проведение комплексного исследования содержания растворимых форм PD-1, PD-L1 (sPD-1, sPD-L1) в сыворотке крови и уровня их экспрессии в опухоли, а также экспрессии IDO1 в опухолях больных колоректальным раком (КРР), с последующим анализом их ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками заболевания и корреляционных связей между указанными маркерами.

В исследование включили 85 первичных больных КРР и 27 здоровых доноров, составивших группу контроля, проходивших обследование и лечение в ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых людей, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019), у всех пациентов выявлена аденокарцинома толстой кишки. Характеристика исследуемой выборки больных КРР представлена в табл. 1.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 определяли в сыворотке крови методом прямого иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA и Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США). Разделение на группы с низким и высоким содержанием sPD1 и sPD-L1 в сыворотке крови проводили относительного их средних значений. Оценку уровня экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухолях проводили методом иммуногистохи-

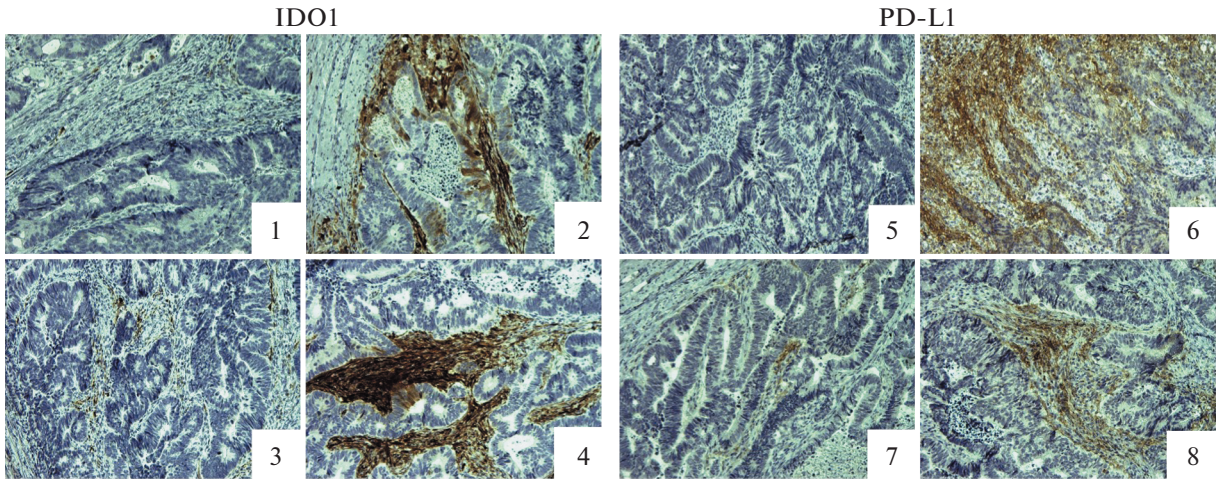

Рис. 2. Экспрессия IDO1 и PD-L1 при КРР. Отсутствие экспрессии IDO1 (1) в опухолевых клетках и PD-L1 (5) в опухолевых и стромальных клетках. Экспрессия IDO1 (2) и PD-L1 (6) в опухолевых и стромальных клетках. Низкое содержание IDO1+ (3) и PD-L1+ (7) клеток в строме опухоли. Высокое содержание IDO1+ (4) и PD-L1+ (8) клеток в строме опухоли.

мии (ИГХ) по стандартной методике с использованием антител к PD-L1 (клон 4E12; Р-Фарм, Россия) и IDO1 (клон D5J4E, Cell Signaling Technology, USA). Для IDO1 и PD-L1 оценивали экспрессию в опухолевых клетках и строме. В зависимости от экспрессии IDO1 и PD-L1 в опухолевых клетках образцы разделены на 2 группы: с наличием и отсутствием экспрессии.

При оценке стромы образцы опухолей разделили на 3 группы с учетом количества PD-L1+ клеток: 0 – отсутствие PD-L1+ клеток, 1 – низкое содержание PD-L1+ клеток, 2 – высокое содержание PD-L1+ клеток. По экспрессии IDO1 в строме опухоли образцы разделили на 2 группы: 1 – отсутствие или низкое содержание IDO1+ клеток; 2 – высокое содержание IDO1+ клеток (рис. 2).

sPD-1 и sPD-L1 при КРР. Анализ результатов исследования показал, что среднее содержание sPD-1 в сыворотке крови здоровых доноров составило 53.07 ± 24.23 пг/мл (11.37–137.8), в группе пациентов с аденокарциномой толстой кишки 47.99 ± 39.32 пг/мл (9.51–287.0). Среднее содержание sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров составило 13.25 ± 10.17 пг/мл (5.19–56.6), в группе пациентов с аденокарциномой 8.82 ± 4.52 пг/мл (3.19–32.81). Результаты представлены на рис. 1.

Проведенный анализ показал, что у больных КРР наблюдается статистически значимое снижение содержания sPD-1 и sPD-L1 (p = 0.0021 и p = 0.0197 соответственно) в сыворотке крови по сравнению с контролем. Для оценки диагностической значимости снижения уровня содержания PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови в качестве маркера КРР проведен ROC анализ. Площадь под ROC-кривой, равная 0.694 для PD-1 и 0.649 для PD-L1, свидетельствует о среднем качестве модели, что не позволяет использовать полученные данные для диагностических целей.

Уровни sPD-1, sPD-L1 и клинико-морфологические характеристики КРР. Провели анализ уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР в зависимости от основных клинико-морфологических характеристик заболевания, результаты представлены в табл. 2.

Выявили, что содержание в сыворотке крови рецептора sPD-1 связано с возрастом, у пациентов в возрасте ≤60 лет уровень маркера ниже по сравнению со старшей возрастной группой (>60 лет). Необходимо отметить, что концентрация sPD-1 и sPD-L1 ассоциирована с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах. В группе пациентов с регионарными метастазами КРР наблюдали более высокое содержание исследуемых маркеров по сравнению с пациентами без распространения опухолевого процесса в лимфоузлах.

Экспрессия PD-L1 и IDO1 при КРР. Методом ИГХ провели анализ экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухолях больных КРР. Обнаружено, что в опухолевых клетках PD-L1 экспрессируется в 26% случаев (22 из 85), а IDO1 в 36% (31 из 85). В строме опухолей IDO1 обнаружен в большинстве образцов, однако сильную инфильтрацию IDO1+ клетками стромы наблюдали в 34% случаев (29 из 85). Для PD-L1 результаты отличались. А именно, 35% образцов (30 из 85) не содержали PD-L1+ клеток в опухолевой строме. В остальных исследованных образцах отмечено наличие PD-L1+ клеток в строме: 35% образцов (30 из 85) составили группу с низкой инфильтрацией и 29% образцов (25 из 85) составили группу с высокой инфильтрацией (рис. 2).

Таблица 2. Ассоциация содержания sPD1 и sPD-L1 с клинико-морфологическими характеристиками КРР

	sPD-1 (пг/мл)		p	sPD-L1 (пг/мл)		p
	низкий	высокий		низкий	высокий	
Возраст						0.49
≤60	23	7	**<0.05**	20	10	
>60	20	35		32	23	
Пол						0.19
мужской	33	13	0.49	25	21	
женский	25	14		27	12	
Стадия						0.23
I–II	42	15	0.14	39	18	
III–IV	16	12		15	13	
Размер опухоли						>0.99
T1-T2	17	10	0.62	17	10	
T3-T4	41	17		35	23	
N – регионарные метастазы						**<0.05**
N0	46	16	**<0.05**	40	22	
N+	9	14		9	14	
M – метастазы						0.20
M0	49	24	0.74	47	26	
M+	9	3		5	7	
Дифференцировка опухоли						0.31
G1	14	7	0.79	15	6	
G2/3	48	21		37	27	
Локализация опухоли						0.65
прямая кишка	23	8	0.47	20	11	
слепая и ободочная кишка	35	19		32	22	

Таблица 3. Ассоциация уровня экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками КРР

	PD-L1 (опухоль)			PD-L1 (строма))			IDO1 (опухоль)			IDO1 (строма))		
	низкий	высокий	*p*	низкий	высокий	*p*	низкий	высокий	*p*	низкий	высокий	*p*
Возраст												
≤60	24	6	0.44	12	18	0.63	21	9	0.480	22	8	0.34
>60	39	16		18	37		33	22		34	21	
Пол												
мужской	34	12	>0.99	16	30	>0.99	28	18	0.654	30	16	>0.99
женский	29	10		14	25		26	13		26	13	
Стадия												
I–II	41	16	0.60	16	41	**<0.05**	33	24	0.154	36	21	0.48
III–IV	22	6		14	14		21	7		20	8	
Размер опухоли												
T1-T2	8	19	0.60	8	19	0.63	15	12	0.34	19	8	0.63
T3-T4	14	44		22	36		39	19		37	21	
N												
N0	44	18	0.40	19	43	0.20	36	26	0.13	39	23	0.44
N+	19	4		11	12		18	5		17	6	
M												
M0	55	18	0.49	23	50	0.10	45	28	0.52	46	27	0.21
M+	8	4		7	5		9	3		10	2	
Дифференцировка опухоли			0.78			0.20			0.44			>0.99
G1	15	6		19	43		15	6		14	7	
G2/3	48	16		11	12		39	25		42	22	
Локализация опухоли												
прямая кишка	23	8	>0.99	10	21	0.81	19	12	0.82	22	9	0.49
слепая и ободочная кишка	40	14		20	34		35	19		34	20	

Далее провели анализ ассоциации уровней экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухолях с клинико-морфологическими характеристиками КРР. Результаты представлены в табл. 3.

Нами выявлено, что только содержание PD-L1+ клеток в строме опухолей ассоциировано со стадией КРР. На начальных I-II стадиях заболевания чаще наблюдали высокую инфильтрацию стромы опухоли PD-L1+ клетками по сравнению с поздними III-IV стадиями.

Корреляционные связи между растворимыми и тканевыми формами PD1, PD-L1 и IDO1. Провели корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены на рис. 3.

Показано, что растворимые формы исследованных белков (sPD-1 и sPD-L1) статистически значимо коррелировали между собой ($r = 0.34$; $p = 0.001$). Также была выявлена корреляционная связь между экспрессией IDO1 в опухолевых клетках и

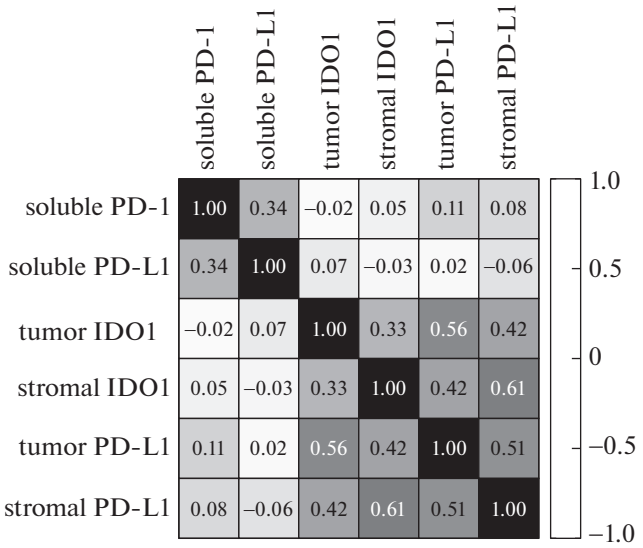

Рис. 3. Корреляционный анализ между экспрессией растворимых и тканевых форм PD-1, PD-L1 и IDO1 (коэффициент корреляции Спирмена).

клетках стромы ($r = 0.33$; $p = 0.002$) и PD-L1 в опухолевых клетках и строме (0.51; $p < 0.001$).

Кроме того, обнаружена корреляционная зависимость между количеством PD-L1 и IDO1 в опухолевых клетках ($r = 0.56$; $p < 0.001$) и в строме ($r = 0.61$; $p < 0.001$). Статистически значимых корреляционных зависимостей между концентрациями sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР и уровнями экспрессии этих маркеров в первичной опухоли не было выявлено. Полученные данные указывают на необходимость дополнительных исследований с целью подтверждения возможности использования исследованных маркеров для диагностических целей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, проект 20-015-00479.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity // Annu Rev Immunol. 2008. V. 26. P. 677–704.
2. *Latchman Y., Wood C.R., Chernova T., et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation // Nat Immunol. 2001. V. 2. № 3. P. 261–8.
3. *Sun C., Mezzadra R., Schumacher T.N.* Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint // Immunity. 2018. V. 48. № 3. P. 434–452.
4. *Platten M., Wick W., Van den Eynde B.J.* Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion // Cancer Res. 2012. V. 72. № 21. P. 5435–40.
5. *Wang R., Green D.R.* Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells // Immunol Rev. 2012. V. 249. № 1. P. 14–26.
6. *Zhai L., Ladomersky E., Lenzen A. et al.* IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints // Cell Mol Immunol. 2018. V. 15. № 5. P. 447–457.

IMMUNOSUPPRESSION FACTORS PD-1, PD-L1, IDO1 AND COLORECTAL CANCER

O. V. Kovaleva[a,#], M. A. Rashidova[a], A. N. Gratchev[a], V. V. Maslennikov[a], I. V. Boulitcheva[a], E. S. Gershtein[a], E. A. Korotkova[a], N. Yu. Sokolov[a], V. V. Delektorskaya[a], Z. Z. Mamedli[a], and Academician of the RAS N. E. Kushlinskii[a]

[a] *N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation*

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

Due to the low efficiency of immunotherapy for colorectal cancer (CRC), it is extremely promising and relevant to study the mechanisms of immunosuppression. In this work, for the first time, a comprehensive study of the expression of soluble and tissue forms of PD-1 and PD-L1 in blood serum and tumors of patients with CRC, as well as IDO1 in tumors has been carried out. The diagnostic and prognostic significance of the studied parameters was determined. A statistically significant decrease in the number of soluble forms of PD-1 and PD-L1 in the blood serum and an association of the number of PD-L1+ cells in the stroma of tumors with the CRC stage were established. The absence of correlations between soluble and tissue forms of the studied proteins was shown, indicating the presence of independent mechanisms of immunosuppression in CRC, which may explain the ineffectiveness of immunotherapy for this type of tumor.

Keywords: colorectal cancer, blood serum, expression, PD-1, PD-L1, IDO1

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 165–168

УДК 571.27

ФОРМИРОВАНИЕ УНИКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ CD8+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ СИНГЕННЫХ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШАМ С ЛИМФОПЕНИЕЙ

© 2021 г. Ю. Ю. Силаева[1,*,#], А. А. Калинина[2,#], Л. М. Хромых[2], А. В. Дейкин[1,3], Д. Б. Казанский[2]

Представлено академиком РАН П.Г. Георгиевым
Поступило 10.11.2020 г.
После доработки 25.11.2020 г.
Принято к публикации 27.11.2020 г.

В условиях лимфопении Т-лимфоциты пролиферируют и приобретают поверхностный активационный фенотип, во многом похожий на фенотип истинных Т-клеток памяти. Мы исследовали фенотипические особенности популяции CD8+ Т-клеток, формирующейся из лимфоцитов донора после адоптивного переноса сингенных спленоцитов сублетально облученным мышам. Указанная популяция экспрессирует маркеры CD44, CD122, CD5, CD49d и хемокиновый рецептор CXCR3. Таким образом, впервые продемонстрирован феномен формирования популяции Т-клеток с признаками супрессорных CD8+ Т-лимфоцитов и истинных клеток памяти.

Ключевые слова: суррогатная Т-клетка памяти, лимфопения, ТКР, CD44, CD62L, CD5, CD122, CD49d, CXCR3

DOI: 10.31857/S2686738921020244

В условиях лимфопении в организме возникают популяции суррогатных CD8+ Т-клеток памяти, по фенотипу похожих на истинные клетки памяти (“memory-like” $CD8^+$, T_{ML}) [1–4]. Данные первоначальных экспериментов позволяли предполагать, что формирующаяся в условиях лимфопении популяция T_{ML} повторяет фенотипические особенности истинных клеток памяти и может заменить их в иммунном ответе [5, 6]. Однако накапливаются доказательства того, что T_{ML} схожи с истинными клетками памяти по профилю экспрессии поверхностных маркеров; вместе с тем имеются ключевые отличия. Так, экспрессия рецепторов хемокинов в T_{ML} отличается от таковой в истинных клетках памяти [7]. Описаны популяции T_{ML} с иммуносупрессорной активностью [8]. Более того, при лимфопении клоны Т-клеток с рецепторами высокоаффинного взаимодействия с собственными молекулами МНС (по существу, аутореактивные Т-клетки) пролиферируют и экспрессируют поверхностные маркеры клеток памяти [9, 10]. В настоящей работе исследован фенотип популяции CD8+ лимфоцитов, образующейся при адоптивном переносе сингенных спленоцитов мышам-реципиентам с лимфопенией после сублетального облучения.

Использованы мыши линий C57BL/6 ($K^bI\text{-}A^bD^b$) и C57BL/6-TgN(ACTbEGFP)1Osb ($K^bI\text{-}A^bD^b$) (далее B6.GFP, https://www.jax.org/strain/003291) (разведение вивария НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). В организме мышей линии B6.GFP GFP экспрессируется конститутивно под контролем куриного промотора бета-актина и цитомегаловирусного энхансера. Не зафиксировано отличий в функционировании иммунной системы трансгенных животных по сравнению с диким типом, что позволило использовать данную линию в экспериментах. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией Института биологии гена РАН. Самок мышей C57BL/6 сублетально облучали (4.5 Гр однократно) на аппарате “Агат-Р” ((Россия), источ-

[#] равный вклад авторов.

[1] *Центр коллективного пользования Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Институт биологии гена” Российской академии наук, Москва, Россия*

[2] *Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

[3] *Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Институт биологии гена” Российской академии наук, Москва, Россия*

**e-mail: silaeva@genebiology.ru*

ник γ-излучения Co^{60} с начальной мощностью 1.9×10^{14} Бк). Животных выводили из эксперимента на 10-й день после облучения, извлекали селезенки и гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере при 4°C. Спленоциты осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин). Эритроциты обрабатывали лизирующим буфером (BD Pharmingen, США). Мононуклеары трижды промывали фосфатно-солевым буфером и использовали для окрашивания моноклональными антителами и адоптивного переноса.

Использовали моноклональные антитела, конъюгированные с соответствующими флуоресцентными метками: PerCP-Cy5.5 – анти-CD8α (клон 53–6.7, BD Bioscience, США), APC-Cy7 – анти-CD62L (клон MEL-14, eBioscience, США), APC – анти-CD44 (клон IM7, eBioscience), PE-Cy7 – анти-CD3 (клон 145-2C11, eBioscience), PE – анти-CD122 (клон TM-β1, BD Bioscience), BV421 – анти-CD5 (клон 53-7.3, BD Biosciences), BV421 – анти-CXCR3 (клон CXCR3-173, BD Biosciences), PE – анти-CD49d (R1-2, BD Biosciences).

Адоптивный перенос осуществляли следующим образом: неиммунизированных мышей C57BL/6 облучали в дозе 4.5 Гр. Через 24 ч после облучения мышам внутривенно (в/в) вводили 1.5×10^7 спленоцитов неиммунизированных сингенных животных или фосфатно-солевой буфер (контроль). Через 10 дней спленоциты мышей-реципиентов использовали для цитофлуориметрического анализа. Спленоциты (3×10^6) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США; 10 мин 4°C), окрашивали флуоресцентно мечеными антителам (40 мин, 4°C) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience). Для характеристики популяций периферических Т-клеток анализировали не менее 10^6 событий в каждом образце. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США). Результаты представлены как средняя величина ± ± стандартная ошибка (M ± SEM). Статистический анализ проводили с использованием непарного критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0.05$.

Обнаружено значительное увеличение относительного количества CD3+ лимфоцитов в селезенке мышей-реципиентов (рис. 1а). Кроме того, доля CD8+ Т-клеток также значительно возрастала у мышей-реципиентов по сравнению с неиммунизированным контролем и сублетально облученными животными (рис. 1а). Это означает, что при адоптивном переносе сингенных спленоцитов пролиферируют в основном CD8+ Т-клетки. Это согласуется с результатами исследований, показавших, что $CD8^+$ клетки нуждаются в меньшем наборе стимулов для гомеостатической пролиферации по сравнению с CD4+ Т-лимфоцитами [11]. Практически все CD8+ Т-лимфоциты как донора, так и реципиента приобрели фенотип CD44+, как и ожидали в условиях лимфопении (рис. 1б). При этом доля потенциально аутореактивных клеток CD8+CD44+CD5+ в популяции лимфоцитов донора была достоверно выше, чем среди лимфоцитов реципиента (рис. 1б). Также значительно возросла доля CD8+CD122+ Т-клеток среди Т-лимфоцитов донора по сравнению с аналогичными популяциями реципиента, неиммунизированных и сублетально облученных мышей (рис. 1б). Отмечено достоверное увеличение доли Т-клеток, экспрессирующих CD49d в популяции клеток донора по сравнению с Т-лимфоцитами реципиента (рис. 1в). Помимо этого, относительное количество Т-лимфоцитов донора, экспрессирующих хемокиновый рецептор CXCR3, было достоверно выше, чем доля таких лимфоцитов в популяции Т-клеток реципиента (рис. 1в).

Таким образом, при адоптивном переносе сингенных спленоцитов в селезенке сублетально облученного реципиента формируется популяция донорских Т-клеток с уникальными фенотипическими характеристиками – одновременной экспрессией маркеров истинных клеток памяти и супрессоров CD8+. Мы полагаем, что поверхностный фенотип, приобретенный Т-лимфоцитами донора в условиях лимфопении, может быть связан с недостатком или избытком сигналов, получаемых Т-лимфоцитами при взаимодействии Т-клеточного рецептора с собственными MHC/пептидными комплексами. Нами показано, что конкуренция за взаимодействие с собственными комплексами MHC-пептид среди Т-лимфоцитов, несущих трансгенную β-цепь ТКР, в мышах линии 1D1b приводит к изменению поверхностного активационного фенотипа по сравнению с Т-клетками этих же животных, экспрессирующих эндогенную β-цепь ТКР [12]. В нашей экспериментальной системе наивные клетки донора могут получать преимущество в связи с высоким уровнем экспрессии молекулы CD5, особенно ввиду того, что значительная часть наивных клеток реципиента погибла в результате сублетального облучения. Кроме того, в формировании обнаруженной популяции большое значение могут иметь изменения в микроокружении Т-лимфоцитов донора, возникшие в результате адоптивного переноса спленоцитов в венозное русло реципиента. Однако вне зависимости от причин, вызвавших появление такого профиля экспрессии поверхностных маркеров, наиболее важным остается вопрос о функциональных характеристиках обнаруженной популяции: способны ли они осуществлять полноценный иммунный ответ или представляют собой популяцию супрессорных Т-клеток? В последнем

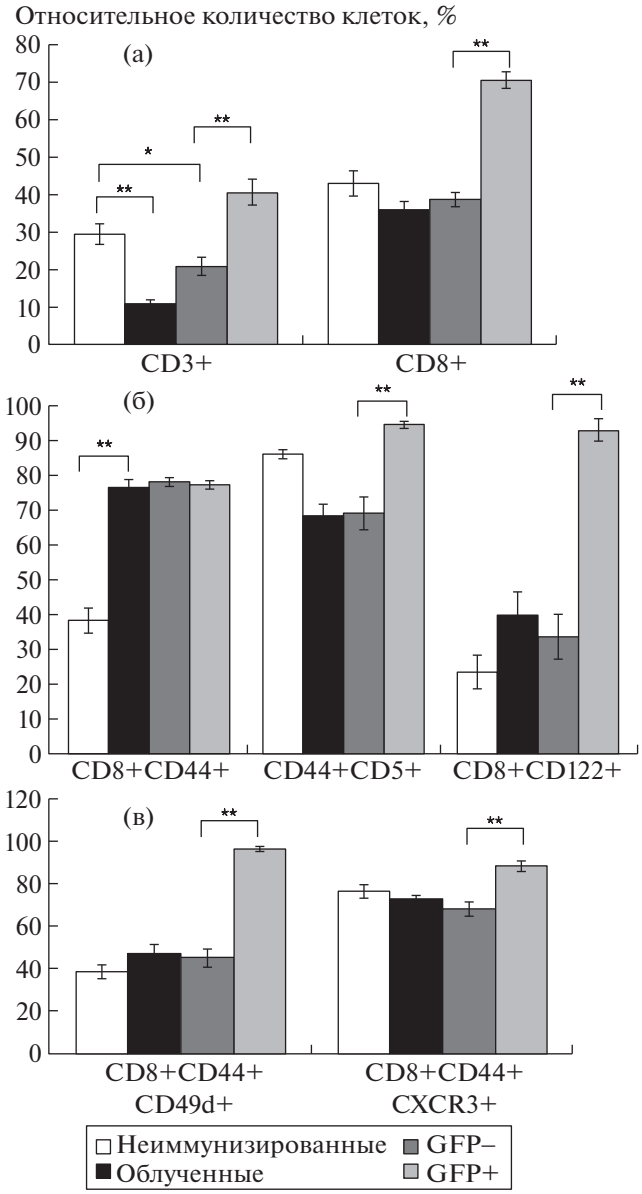

Рис. 1. Относительное количество популяций Т-лимфоцитов в селезенке сублетально облученных мышей-реципиентов после адоптивного переноса сингенных спленоцитов. а – Относительное количество CD3+ и CD3+CD8+ Т-клеток в селезенке сублетально облученных реципиентов. Представлены данные для контрольных групп (неиммунизированные, облученные), отдельно для клеток реципиента (GFP-) и донора (GFP+). Здесь и на рис. 1а–1б: данные получены в трех независимых экспериментах, 4–6 животных в каждой группе. Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента (*$p \le 0.05$, **$p \le 0.01$). б – Относительное количество CD8+CD44+, CD44+CD5+ и CD8+CD122+ Т-клеток в селезенке сублетально облученных реципиентов. в – Относительное количество CD8+CD44+CD49d+ и CD8+CD44+CXCR3+ Т-клеток в селезенке сублетально облученных реципиентов.

варианте полученные результаты могут иметь практическое значение для практики переливания крови и пересадки костного мозга, поскольку подобные популяции могут формироваться у пациентов [13], поэтому изучение функциональных характеристик обнаруженной популяции чрезвычайно важно и станет предметом наших дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Мегагрантом (Договор №14.W03.31.0020 между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки “Институт биологии гена” Российской академии наук). Использовано оборудование Центра коллективного пользования ФГБУН ИБГ РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cho B.K., Rao V.P., Ge Q., Eisen H.N., & Chen J.* Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells // The Journal of experimental medicine. 2000. V. 192. № 4. P. 549–556.
2. *Goldrath A.W., Bogatzki L.Y., & Bevan M.J.* Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation // The Journal of experimental medicine. 2000. V. 192. № 4. P. 557–564.
3. *Murali-Krishna K., & Ahmed R.* Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells // Journal of immunology. 2000. V. 165. № 4. P. 1733–1737.
4. *Stephen C. Jameson, You Jeong Lee, and Kristin A.* Hogquist Innate Memory T cells // Adv Immunol., 2015. V. 126. P. 173–213. https://doi.org/10.1016/bs.ai.2014.12.001
5. *Moxham V.F., Karegli J., Phillips R.E., Brown K.L., Tapmeier T.T., Hangartner R., Sacks S.H., Wong W.* Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection // Journal of immunology. 2008. V. 180. № 6. P. 3910–3918.
6. *Steve Oghumu, Cesar A. Terrazas, Sanjay Varikuti, Jennifer Kimble, Stephen Vadia, Lianbo Yu, Stephanie Seveau, and Abhay R. Satoskar.* CXCR3 expression defines a novel subset of innate CD8+ T cells that enhance immunity against bacterial infection and cancer upon stimulation with IL-15 // FASEB J. 2015. V. 29. P. 1019–1028.
7. *Cheung K.P., Yang E., & Goldrath A.W.* Memory-like CD8+ T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells // Journal of immunology. 2009. V. 183. V. 5. P. 3364–3372. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900641
8. *Wang L.X., Li Y., Yang G., Pang P., Haley D., Walker E.B., Hu H.M.* CD122+ CD8+ Treg suppress vaccine-induced antitumor immune responses in lymphodepleted

mice // European journal of immunology. 2010. V. 40. № 5. P. 1375–1385.
https://doi.org/10.1002/eji.200839210.CD122

9. *Le Campion A., Gagnerault M., Auffray C., Bécourt C., Poitrasson-Rivière M., Lallemand E., Lucas B.* Lymphopenia-induced spontaneous T-cell proliferation as a cofactor for autoimmune disease development // Blood. 2009. V. 114. № 9. P. 1784–1793.
https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192120
10. *Jason T. White, Eric W. Cross, Matthew A. Burchill, Thomas Danhorn, Martin D. McCarter, Hugo R. Rosen, Brian O'Connor & Ross M. Kedl.* Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner // Nat Commun. 2016. V. 7. P. 11291.
https://doi.org/10.1038/ncomms11291
11. *Hickman S.P., Turka L.A.* Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005. V. 360. № 1461. P. 1713–1721.
https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1699
12. *Silaeva Y.Y., Kalinina A.A., Vagida M.S., Khromykh L.M., Deikin A.V., Ermolkevich T.G., Sadchikova E.R., Goldman I.L, Kazansky D.B.* Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β-chain expression. // Biochemistry (Mosc). 2013. V. 78. № 5. P. 549–559.
https://doi.org/10.1134/S0006297913050143
13. *Luc Van Kaer.* Innate and virtual memory T cells in man. // Eur J Immunol. 2015. V. 45. № 7. P. 1916–1920.
https://doi.org/10.1002/eji.201545761

FORMATION OF A UNIQUE POPULATION OF CD8 + T-LYMPHOCYTES AFTER ADOPTIVE TRANSFER OF SYNGENEIC SPLENOCYTES TO MICE WITH LYMPHOPENIA

Y. Yu. Silaeva[a,*,#], A. A. Kalinina [b,#], L. M. Khromykh[b], A. V. Deykin [a,c], and D. B. Kazansky[b]

[a] *Core Facility Centre, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[b] *Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

[c] *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

**e-mail: silaeva@genebiology.ru*

Presented by Academician of the RAS P.G. Georgiev

Under [1]lymphopenia conditions, T-lymphocytes proliferate and acquire an activation phenotype like that of true memory T-cells. We investigated the surface phenotype of the CD8+ T-cell population formed from donor lymphocytes after adoptive transfer of syngeneic splenocytes to sublethally irradiated C57BL/6 mice. This population expresses CD44, CD122, CD5, CD49d antigens and the chemokine receptor CXCR3. Thus, we demonstrated, for the first time, that T-cells with simultaneous expression of the markers of suppressor CD8+ T-lymphocytes and true memory cells can be generated in the lymphopenic organism.

Keywords: virtual memory T-cell, lymphopenia, TCR, CD44, CD62L, CD5, CD122, CD49d, CXCR3

[#] Equal contribution.

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 169–174

УДК 579.62

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОМА МОЛОКА КОРОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИИ МАСТИТОМ

© 2021 г. К. К. Фурсова[1,2], , С. Л. Соколов[1,2,3], М. П. Щанникова[1,2]*, Д. А. Никанова[1], О. А. Артемьева[1], Е. Н. Колодина[1], А. С. Сорокин[4], Т. Р. Джелядин[4], И. В. Шульчева[1,2], А. О. Шепеляковская[2], академик РАН А. Зиновьева[1], Ф. А. Бровко[1,2]

Поступило 02.11.2020 г.
После доработки 27.11.2020 г.
Принято к публикации 28.11.2020 г.

Анализ микрофлоры молока от здоровых коров и с патологией мастита (клиническая и субклиническая формы) на фермах Центрального региона РФ показал, что у больных животных отмечается увеличение ОТЕ протеобактерий, относящихся в основном к *Pseudomonadales, Burkholderiales*, а также к *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Bacillaceae*. Доля ОТЕ *Planococcaceae* снижалась. У больных животных менялось соотношение редко представленных ОТЕ.

Ключевые слова: микробиом молока, мастит, омиксные технологии

DOI: 10.31857/S2686738921020086

Мастит крупного рогатого скота (КРС) – экономически значимое заболевание, уменьшающее продуктивность животных и качество молока [1]. Основные данные о микробном составе молока были получены методами классической микробиологии. Однако известна проблема оценки микробного состава, связанная с трудно-культивируемыми формами. На современном этапе широко используются омиксные технологии, позволяющие исследовать полный состав флоры и сделать предположения о связи объекта и запускаемого им процесса [2]. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ микробных композиций здоровых животных и животных с субклинической и клинической формами мастита.

Отбор проб молока проводился асептически на фермах Центрального региона РФ (Московская и Тульская область) в летний период 2018 г. от коров черно-пестрой голштинизированной породы из каждой доли вымени отдельно, через 60–70 дней после отела. Выборка коров сформирована на основании количества соматических клеток (SCC, клеток/мл) в молоке, которое оценивалось с помощью лазерной проточной цитометрии (Somacount-150, “Bentley Instruments”, США). Для настоящего исследования был отобран 31 образец, выделены группы: 1 – клинически здоровые животные (З), 10 образцов, SCC менее 1.00×10^5; 2 – субклинический мастит (С), 10 образцов, SCC 1.00×10^5–5.00×10^5 – клинический мастит (К), 11 образцов, SCC выше 1.00×10^6.

Общая микробная ДНК выделялась из образцов с помощью набора Milk Bacterial DNA Isolation Kit (“Norgen Biotek”, Канада) в соответствии с инструкциями производителя. Вариабельные области V3–V4 гена 16S рРНК амплифицировались с использованием набора универсальных праймеров. Библиотеку готовили по протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США) и секвенировали (MiSeq 2 × 250) [3].

Аннотирование нуклеотидных последовательностей проводили с помощью ресурса MG-RAST [4]. Для аннотирования была использована база данных GreenGenes (https://greengenes.secondgenome.com). Окончательный сравнительный анализ изменения количества ОТЕ (оперативных таксономических единиц) в структурах микро-

[1] *Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, Россия*

[2] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино, Россия*

[3] *Федеральное государственное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пущино, Россия*

[4] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр “Пущинский научный центр биологических исследований РАН” Федеральное государственное учреждение науки Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Россия*

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

Таблица 1. Наиболее распространенные ОТЕ в исследованных образцах (baseMean >1000.000). ggid – идентификационный номер нуклеотидной последовательности в базе данных Greengenes; baseMean – среднее нормализованное значение встречаемости ОТЕ, деленное на факторы размерности по всем образцам

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean
139717	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	48532.306
439966	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	31888.226
512109	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	31880.267
34155	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus sciuri*	26187.590
284012	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*	25218.210
35834	*Burkholderiales*	*Alcaligenaceae*	*Oligella*	9871.205
136245	*Lactobacillales*	*Aerococcaceae*	*Aerococcus*	7319.766
591807	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	6066.413
137946	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	5218.415
342500	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	4961.609
150126	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas viridiflava*	4681.428
283209	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*	3250.984
575037	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus haemolyticus*	3180.100
30292	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas viridiflava*	2986.131
152780	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas viridiflava*	2886.250
8736	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*	2873.531
242021	*Burkholderiales*	*Oxalobacteraceae*	*Ralstonia*	2806.305
352959	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	2514.020
187243	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia glathei*	2417.492
546105	*Lactobacillales*	*Aerococcaceae*	*Facklamia*	2283.308
170909	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus sciuri*	2216.412
204877	*Burkholderiales*			2022.288
531620	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	1870.370
280267	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*	1724.679
12332	*Actinomycetales*	*Cellulomonadaceae*	*Cellulomonas*	1722.031
501234	*Lactobacillales*	*Streptococcaceae*	*Streptococcus*	1598.733
135979	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	1552.605
125947	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia bryophila*	1453.993
115314	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas viridiflava*	1410.329
292932	*Burkholderiales*	*Alcaligenaceae*	*Sutterella*	1242.447
151845	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	1222.461
240697	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus sciuri*	1150.807
279311	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*	1130.597
13438	*Actinomycetales*	*Corynebacteriaceae*	*Corynebacterium*	1111.792
109810	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	1084.266
589865	*Lactobacillales*	*Carnobacteriaceae*	*Carnobacterium*	1067.272
329685	*Desulfovibrionales*	*Desulfohalobiaceae*		1042.922

биомов был проведен при помощи программного пакета DESeq2 R [5]. (табл. 1–3).

Из полученных данных при сравнении групп З/К/С видно, что общего изменения по разнообразию микрофлоры не происходило. Во всех трех группах превалирует тип *Proteobacteria* (63.8–87.2%), далее следует тип *Firmicutes* (11.6–35.2%). Известно, что у коров голштино-фризской породы в здоровом вымени превалирует тип *Firmicutes*, с преобладанием рода *Streptococcus* [6]. Можно предположить, что в нашем случае происходит вытеснение типа *Firmicutes* протеобактериями.

Таблица 2. OTE, значение которых снижается при переходе от здоровых образцов молока к больным (З/С/М). ggid – идентификационный номер нуклеотидной последовательности в базе данных Greengenes; baseMean – среднее нормализованное значение встречаемости OTE, деленное на факторы размерности по всем образцам; log2FoldChange – значение размера эффекта изменения встречаемости OTE, выраженное в виде двоичного логарифма; lg p value – десятичный логарифм значимой вероятности (P-значения)

клинически здоровые по сравнению с клиническим маститом (17 OTEs)

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
572224	*Lactobacillales*	*Carnobacteriaceae*	*Trichococcus*	151.286	–26.453	–20.628
223893	*Enterobacteriales*	*Enterobacteriaceae*	*Klebsiella*	17.547	–17.312	–12.719
5266	*Rhizobiales*	*Rhizobiaceae*	*Agrobacterium*	32.933	–23.119	–7.654
159464	*Rhodobacterales*	*Rhodobacteraceae*	*Paracoccus aminovorans*	22.007	–23.182	–7.296
112355	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus*	19.819	–5.472	–6.948
530933	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*		57.110	–11.031	–6.653
6847	*Burkholderiales*	*Alcaligenaceae*		8.060	–20.870	–6.375
8111	*Oceanospirillales*	*Halomonadaceae*	*Candidatus Portiera*	20.674	–24.273	–6.380
204877	*Burkholderiales*			2022.288	–5.656	–5.978
73090	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*		90.466	–11.959	–5.583
233509	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas stutzeri*	16.716	–3.915	–5.357
110075	*Alteromonadales*	*Alteromonadaceae*	*BD2-13*	32.271	–6.277	–5.195
14872	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus*	906.487	–5.629	–4.719
299198	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas fragi*	26.604	–4.228	–4.662
242021	*Burkholderiales*	*Oxalobacteraceae*	*Ralstonia*	2806.305	–4.304	–4.199
159316	*Actinomycetales*	*Cellulomonadaceae*	*Actinotalea*	25.134	–4.895	–4.149
465131	*Neisseriales*	*Neisseriaceae*		11.105	–5.193	–4.139

клинически здоровые по сравнению с субклиническим маститом (9 OTEs)

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
223893	*Enterobacteriales*	*Enterobacteriaceae*	*Klebsiella*	17.547	–14.705	–10.826
5266	*Rhizobiales*	*Rhizobiaceae*	*Agrobacterium*	32.933	–20.643	–7.917
572224	*Lactobacillales*	*Carnobacteriaceae*	*Trichococcus*	151.286	–14.406	–7.567
342500	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	4961.609	–6.407	–7.345
6847	*Burkholderiales*	*Alcaligenaceae*		8.060	–19.274	–7.002
144654	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	98.700	–4.105	–3.962
240697	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus sciuri*	1150.807	–4.472	–3.876
173367	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	354.915	–3.927	–3.713
327301	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*		48.307	–4.027	–3.649

субклинический мастит по сравнению с клиническим маститом (8 OTEs)

ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
109019	*Clostridiales*	*Lachnospiraceae*		37.346	–23.106	–18.373
159464	*Rhodobacterales*	*Rhodobacteraceae*	*Paracoccus aminovorans*	22.007	–36.753	–12.250
290481	*Sphingomonadales*	*Sphingomonadaceae*	*Kaistobacter*	31.143	–23.639	–10.977
363585	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*		15.914	–24.203	–8.879
141892	*Xanthomonadales*	*Xanthomonadaceae*		4.011	–18.259	–6.244
289700	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	39.264	–4.626	–4.458
144702	*Burkholderiales*	*Oxalobacteraceae*	*Ralstonia*	52.628	–7.459	–4.174
148758	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus sciuri*	705.344	–3.350	–3.015

Таблица 3. ОТЕ, значение которых повышается при переходе от здоровых образцов молока к больным (З/С/М). ggid – идентификационный номер нуклеотидной последовательности в базе данных Greengenes; baseMean – среднее нормализованное значение встречаемости ОТЕ, деленное на факторы размерности по всем образцам; log2FoldChange – значение размера эффекта изменения встречаемости ОТЕ, выраженное в виде двоичного логарифма; lg p value – десятичный логарифм значимой вероятности (P-значения)

клинически здоровые по сравнению с клиническим маститом (2 OTEs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
12506	*Actinomycetales*	*Micrococcaceae*	*Kocuria*	17.759	20.787	–13.361
556122	*Actinomycetales*	*Micrococcaceae*	*Micrococcus luteus*	14.382	20.824	–6.731
клинически здоровые по сравнению с субклиническим маститом (14 OTEs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
109019	*Clostridiales*	*Lachnospiraceae*		37.346	21.819	–27.672
290481	*Sphingomonadales*	*Sphingomonadaceae*	*Kaistobacter*	31.143	23.078	–18.134
266902	*Methylophilales*	*Methylophilaceae*	*Methylobacillus*	13.012	27.332	–14.487
247748				26.327	23.239	–14.310
363585	*Burkholderiales*	*Comamonadaceae*		15.914	20.666	–11.441
147889	*Acholeplasmatales*	*Acholeplasmataceae*	*Candidatus Phytoplasma*	9.155	20.826	–10.834
141892	*Xanthomonadales*	*Xanthomonadaceae*		4.011	17.243	–9.566
12402	*Actinomycetales*			8.049	18.849	–6.445
542062	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas*	3.518	14.712	–4.424
182827	*Xanthomonadales*	*Sinobacteraceae*	*Nevskia*	29.578	8.187	–4.363
98908	*Coriobacteriales*	*Coriobacteriaceae*		46.788	6.249	–3.814
366394	*Sphingobacteriales*	*Sphingobacteriaceae*	*Pedobacter*	26.400	4.113	–3.685
525865	*Pseudomonadales*	*Moraxellaceae*	*Acinetobacter*	7.052	6.487	–3.295
137283	*Bacillales*	*Paenibacillaceae*	*Paenibacillus amylolyticus*	6.539	6.301	–3.250
субклинический мастит по сравнению с клиническим маститом (16 OTEs)						
ggid	Отряд	Семейство	Вид	baseMean	log2FoldChange	lg p value
572224	*Lactobacillales*	*Carnobacteriaceae*	*Trichococcus*	151.286	27.342	–13.885
279973	*Pseudomonadales*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonas fragi*	9.330	18.071	–9.677
13949	*Clostridiales*	*Lachnospiraceae*	*Butyrivibrio*	5.039	21.438	–8.982
560590	*Actinomycetales*	*Intrasporangiaceae*	*Janibacter*	30.283	20.901	–8.667
324188	*Rhizobiales*	*Hyphomicrobiaceae*	*Devosia*	17.330	21.086	–7.827
593609	*Bacillales*	*Bacillaceae*	*Bacillus*	17.236	18.423	–7.495
592739	*Oceanospirillales*	*Oceanospirillaceae*	*Oleibacter*	10.695	19.170	–7.218
253764	*Bacillales*	*Bacillaceae*	*Bacillus*	13.625	17.358	–6.835
538247	*Actinomycetales*	*Micrococcaceae*		35.250	17.906	–6.385
351345	*Alteromonadales*	*Idiomarinaceae*	*Pseudidiomarina*	43.403	22.798	–5.596
544146	*Clostridiales*	*Lachnospiraceae*	*Coprococcus*	3.551	17.983	–4.913
163187	*Bacillales*	*Bacillaceae*		13.517	16.409	–4.803
240697	*Bacillales*	*Staphylococcaceae*	*Staphylococcus sciuri*	1150.807	6.599	–4.400
153024	*Actinomycetales*	*Streptomycetaceae*	*Streptomyces*	8.683	19.990	–3.826
91742	*Rhizobiales*	*Phyllobacteriaceae*	*Pseudaminobacter*	32.544	16.299	–3.536
342500	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	*Burkholderia*	4961.609	5.125	–2.855

Так, при переходе от З к С значительно увеличивается содержание бактерий *Pseudomonadales* (26.8–42.9%) и *Burkholderiales* (24.3–37.2%). Среди представителей этих отрядов описаны возбудители мастита [7].

Уровень ОТЕ отряда *Bacillales* в трех группах примерно одинаковый. Однако при переходе от уровня отряда к семействам видно, что сем. *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Bacillaceae* возрастают у больных животных. Представители этих

семейств описаны как основные возбудители воспалительных заболеваний КРС, в том числе мастита. Так, в качестве основных патогенов, ассоциированных с маститом, в литературе описаны *Escherichia coli, Streptococcus, Staphylococcus* [8], хотя внутри семейств наблюдаются различия в представителях [9].

В нашем случае высокая доля бактерий семейства *Aerococcaceae* сохранялась во всех трех категориях, доля *Planococcaceae* понижалась в образцах К/С. Ранее *Aerococcaceae* и *Planococcaceae* описаны как основные представители микрофлоры молока здоровых коров [10]. *Planococcaceae* также представлены в кишечнике КРС и составляют до 18% фекальной бактериальной популяции [11].

При рассмотрении семейства *Staphylococcaceae* во всех группах доминирует патоген *S. sciuri*. Кроме того, во всех образцах молока встречаются *Macrococcus caseolyticus*. По своим свойствам эти два вида, ранее относящиеся к роду *Staphylococcus*, близки, идентичность нуклеотидных последовательностей их генов 16S рРНК составляет >95.5% [12]. Поэтому мы рассматриваем *S. sciuri* и *M. caseolyticus* как группу *S. sciuri*.

Анализ присутствия *Staphylococcaceae* в пробах показал, что в отдельных образцах с увеличением SCC возрастает содержание *S. haemolyticus*. В то же время наибольшее количество *S. haemolyticus* находится в пробе с SCC=2.87×10^6, тогда как в пробе со значением SCC=5.19×10^6 присутствие *S. haemolyticus* незначительно. Содержание *S. haemolyticus* также различается в пробах молока, взятых из разных долей вымени у одного животного с примерно одинаковым значением SCC. Поэтому мы не можем однозначно утверждать, что увеличение SCC коррелирует с увеличением количества *S. haemolyticus*.

S. epidermidis обнаружен в большинстве исследованных образцов и в некоторых случаях содержится на высоком уровне. В отдельных образцах молока обнаружен *S. aureus*.

При сравнении количественных и качественных изменений микробиома для субклинической формы и клинического мастита не обнаруживается изменений среди наиболее распространенных OTE (baseMean >1000.000) (дополнительные материалы статьи). Однако среди OTE с меньшим распространением такие изменения есть. Заметно, что при переходе от образцов З к С/К уменьшается число *Burkholderiales*, в то время как увеличивается присутствие *Actinomycetales*.

Хотя представители этих отрядов описаны как представители нормальной микрофлоры молока, ряд видов *Actinomycetales* являются патогенами, ассоциированными с маститом [13].

Интересно, что во всех образцах обнаруживается в значительных количествах *Pseudomonas viridiflava*. Этот микроорганизм до сих пор обнаруживался исключительно на растениях [14], и ранее не был замечен в молоке коров. Возможно, *P. viridiflava* могут попадать в молоко извне через протоки молочной железы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 20-16-00106.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heikkilä A.M., Nousiainen J.I., Pyörälä S.* Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 1. P. 139–150.
2. *Knight R., Vrbanac A., Taylor B.C., et al.* Best practices for analysing microbiomes // Nat. Rev. Microbiology. 2018. V. 16. № 7. P. 410–422.
3. *Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // Nucleic Acids Research. 2013. V. 41. № 1. P. e1.
4. *Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., et al.* The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. № 1. P. 386.
5. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // Genome Biology. 2014. V. 15. № 550.
6. *Cremonesi P., Ceccarani C., Curone G., et al.* Milk microbiome diversity and bacterial group prevalence in a comparison between healthy Holstein Friesian and Rendena cows // PLoS One. 2018. V. 13. № 10. P. e0205054
7. *Plummer P.J., Plummer C.* Diseases of the Mammary Gland. // Sheep and Goat Medicine. 2012. P. 442–465.
8. *Keane O.M.* Symposium review: Intramammary infections – Major pathogens and strain-associated complexity // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 5. P. 4713–4726.
9. *Condas L., De Buck J., Nobrega D.B., et al.* Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds // J Dairy Sci. 2017. V. 100. № 7. P. 5592–5612.
10. *Ganda E.K., Bisinotto R.F., Lima S.F., et al.* Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin // Scientific Reports. 2016. V. 6. P. 37565. https://doi.org/10.1038/srep37565
11. *Korsak N., Taminiau B., Hupperts C. et al.,* Assesment of bacterial superficial contamination in classical or ritually slaughtered cattle using metagenetics and microbiological analysis // Int J Food Microbiol. 2017. V. 17. № 247. P. 79–86.
12. *Kloos W.E., Ballard D.N., George C.G., et al.* Delimiting the genus Staphylococcus through description of Macrococcus caseolyticus gen. nov., comb. nov. and Macrococcus equipercicus sp. nov., and Macrococcus bovicus sp. no. and Macrococcus carouselicus sp. nov. // Int J Syst Bacteriol. 1998. V. 48. Pt 3. P. 859–877. https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-859

13. *Hamid M.E.* Dietzia species as a cause of mastitis: Isolation and identification of five cases from dairy cattle // African Journal of Microbiology Research. 2013. V. 7. № 29. P. 3853–3857.

14. *Sarris P.F., Trantas E.A., Mpalantinaki E., et al.* Pseudomonas viridiflava, a Multi Host Plant Pathogen with Significant Genetic Variation at the Molecular Level // PLoS One. 2012. V. 7. № 4. P. e36090.

CHANGES IN THE MICROBIOME OF MILK IN COWS WITH MASTITIS

K. K. Fursova[a,b], S. L. Sokolov[a,b,c], M. P. Shchannikova[a,b,#], D. A. Nikanova[a], O. A. Artem'eva[a], E. N. Kolodina[a], A. S. Sorokin[d], T. R. Dzhelyadin[d], I. V. Shulcheva[a,b], A. O. Shepelyakovskaya[b], Academician of the RAS N. A. Zinovieva[a], and F. A. Brovko[a,b]

[a] *L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Moscow, Russian Federation*

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

[c] *FRC PRCBR, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry & Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

[d] *FRC PRCBR, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

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

Analysis of the milk micrbiomes from healthy cows and cows with different forms of mastitis (clinical and subclinical) on two farms of the Central Russia was conducted. Increasing of phylum *Proteobacteria* mainly related to *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, as well as *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, and *Bacillaceae* was detected in animals with mastitis. *Planococcaceae* OTUs percentage has been decreased at the same time. The ratio of rarely presented OTUs was changed also in the milk form animals with mastitis.

Keywords: milk microbiome, mastitis, omix technologies

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 175–179

УДК 541.64 57.083 535.015

НАНОКРИСТАЛЛЫ С АНТИСТОКСОВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЕЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИСИАЛОВОЙ КИСЛОТОЙ, ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ *IN VIVO*

© 2021 г. П. А. Демина[1,2,*], Н. В. Шолина[2,3], Р. А. Акасов[1,2,3], Д. А. Хоченков[4], А. В. Нечаев[5], И. В. Балалаева[6], Е. В. Хайдуков[1,2,3], А. Н. Генералова[1,2], академик РАН С. М. Деев[1]

Поступило 13.10.2020 г.
После доработки 30.11.2020 г.
Принято к публикации 30.11.2020 г.

Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ) являются перспективной платформой для создания биореагентов при *in vivo* визуализации под действием ближнего инфракрасного излучения, способного проникать глубоко в биоткани, сохраняя высокое соотношение сигнал/шум. В случае визуализации солидных опухолей необходима биофункционализация поверхности НАФ, обеспечивающая длительное время циркуляции наночастиц наряду с биосовместимостью, нетоксичностью. Это определяет эффективное накопление НАФ в опухоли за счет нарушенной архитектуры сосудистой сетки и лимфодренажа. В данной работе впервые представлен подход к биофункционализации НАФ с использованием эндогенной полисиаловой кислоты и создания реагентов, отвечающих требованиям для *in vivo* исследований. Реагенты характеризовались низким уровнем неспецифической адсорбции белков и захвата макрофагами, что позволило увеличить время циркуляции в кровотоке малых животных до 3 ч и регистрировать интенсивный фотолюминесцентный сигнал в опухоли.

Ключевые слова: апконвертирующие нанофосфоры, биовизуализация, функционализация поверхности, полисиаловая кислота

DOI: 10.31857/S2686738921020062

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основные тенденции развития медицины связаны с разработкой персонализированного подхода к диагностике и терапии. Для решения этих задач значительные перспективы имеют методы, основанные на применении наночастиц, выступающих в качестве наноплатформы для создания мультимодальных реагентов. В качестве таких наночастиц большой интерес представляют неорганические нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией (НАФ), для активации которой используют ближний ИК-свет, что позволяет реализовать визуализацию солидных опухолей [1]. При этом биофункционализация поверхности НАФ отвечает за формат проведения биоанализа, например, в виде пассивной, адресной или магнитоуправляемой (в случае функционализации магнитными наночастицами) доставки [2]. Для эффективного накопления НАФ в солидных опухолях необходимо решить задачу их длительной циркуляции в кровотоке, что связано с созданием биосовместимой нетоксичной поверхности, предотвращающей агрегацию наночастиц, в частности, протекающую через образование комплексов с белками крови, а также не вызывающей иммунного ответа. В этом случае НАФ могут быть доставлены в опухоль за счет пассивного механизма, основанного на эффекте повышенной проницаемости и удержания наночастиц в сосудах (EPR-эффекта), связанного с гиперваскуляризацией и нарушением лимфодренажа в опухоли [3]. Такая биофункционализация поверхности НАФ может быть реализована

[1] *ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия*
[2] *ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, Россия*
[3] *ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*
[4] *ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России, Москва, Россия*
[5] *РТУ МИРЭА; Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[6] *ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского", Нижний Новгород, Россия*
**e-mail: Polidemina1207@yandex.ru*

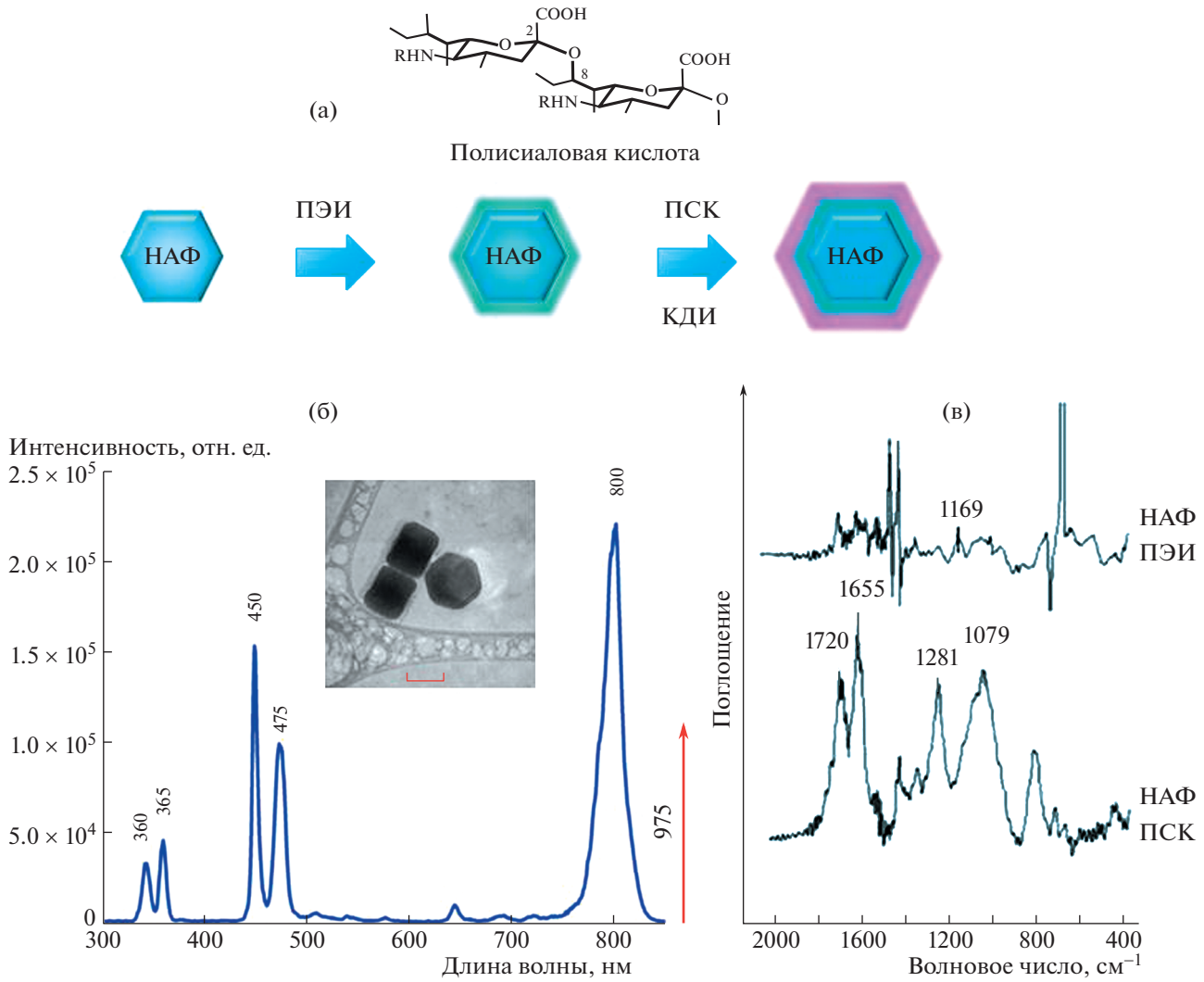

Рис. 1. (а) Структурная формула полисиаловой кислоты и схема модификации НАФ с использованием ПСК; (б) Спектр фотолюминесценции НАФ при длине волны возбуждения 975 нм и НАФ, шкала 50 нм; (в) ИК-Фурье спектры после модификации НАФ ПЭИ (сверху) и ПСК (снизу).

при использовании эндогенного полимера, в качестве которого в данной работе выбрали полисиаловую кислоту (ПСК). ПСК представляет собой высокогидрофильный неиммуногенный, нетоксичный гомополимер α-2,8 5-N-ацетилнейраминовой кислоты, деградирующий под действием нейраминидазы до биосовместимой сиаловой кислоты [4]. В водной среде ПСК существует в виде ассоциатов с молекулами воды, что существенно снижает адсорбцию белков крови и, как результат, увеличивает время циркуляции наночастиц в кровеносной системе [5]. Например, получение конъюгатов ПСК с белками позволило получить препараты с улучшенной фармакокинетикой, что было продемонстрировано в работе [6].

Целью данной работы является разработка метода биофункционализации НАФ с использованием ПСК, обеспечивающего создание фотолюминесцентных биореагентов для визуализации солидных опухолей *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

НАФ со структурой ядро/оболочка ($NaYF_4$: $Yb^{3+}/Tm^{3+}@NaYF_4$), имеющие средний размер 90 ± 6 нм, были синтезированы при использовании описанного ранее сольвотермического метода [7]. Гидрофобную поверхность НАФ модифицировали ПСК в две стадии. Сначала гидрофилизировали поверхность при участии полиэтиленимина (ПЭИ) с использованием метода замены растворителя. Для этого НАФ, диспергированные в хлороформе, смешивали с раствором ПЭИ в том же растворителе. Смесь выдерживали при перемешивании в течение часа для адсорбции полимера на поверхности, после чего по каплям добавляли

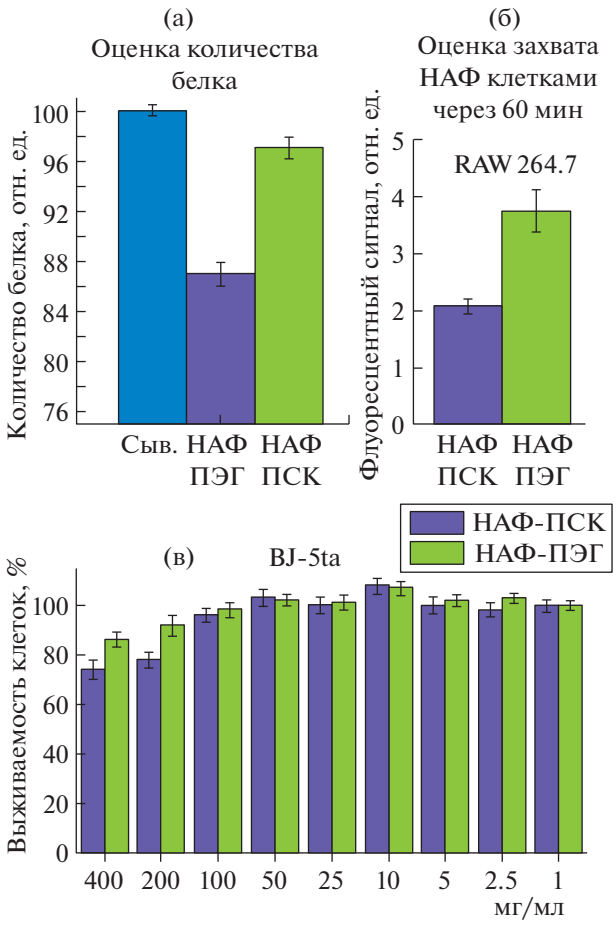

Рис. 2. (а) Количество белка в надосадочной жидкости после инкубации образцов НАФ в сыворотке: НАФ-ПЭГ, НАФ-ПСК, контроль – чистая сыворотка; (б) Нормированный флуоресцентный сигнал НАФ-ПСК и НАФ-ПЭГ, накопленных в клетках макрофагов мыши RAW 264.7; (в) Выживаемость фибробластов кожи человека BJ-5ta после 72 ч инкубации с наночастицами НАФ-ПЭГ и НАФ-ПСК.

в воду при ультразвуковой обработке. После испарения растворителя получали водную дисперсию наночастиц, модифицированных ПЭИ с аминогруппами на поверхности и имеющих дзета-потенциал +42 мВ [8]. На втором этапе проводили модификацию НАФ полисиаловой кислотой за счет формирования ковалентной связи между аминогруппой ПЭИ и карбоксильной группой кислоты с использованием метода карбодиимидной активации (рис. 1а). В результате модификации получали коллоидно-стабильные в буферных растворах нанокомплексы НАФ-ПСК (дзета-потенциал –32 мВ), сохраняющие агрегативную устойчивость в течение 2 мес. Наличие ПСК на поверхности НАФ было подтверждено ИК-Фурье спектроскопией по появлению основных характеристических пиков ПСА в области 1079, 1281, 1655, 1720 см$^{-1}$ (рис. 1в).

Эффективное накопление НАФ в солидной опухоли зависит от времени их циркуляции в кровотоке, что непосредственно связано с адсорбцией белков крови. Неспецифическую адсорбцию оценивали по содержанию белков в надосадочной жидкости (по методу Брэдфорда) после центрифугирования образцов, предварительно проинкубированных в растворе сыворотки крови мыши (1 ч, 37°C). Высокая концентрация белка в надосадочной жидкости свидетельствовала о незначительном количестве белка, адсорбированного на поверхности НАФ (рис. 2а).

Это позволило сделать вывод, что покрытие из ПСК в сравнении с полиэтиленгликолем (ПЭГ), признанным лидером среди полимеров-модификаторов для *in vivo* исследований [9], в значительной мере предохраняет от образования “белковой короны”, которая может приводить к агрегации НАФ и их быстрому выводу из кровотока.

При получении реагентов для *in vivo* исследований необходимо также, чтобы НАФ были “невидимы” для клеток в кровотоке, в частности, не вызывали фагоцитарной активности. Оценку уровня захвата НАФ-ПСА клетками проводили на линии макрофагов мыши RAW 264.7 в сравнении с НАФ, модифицированных ПЭГ (рис. 2б), с помощью проточной цитометрии, предварительно включив краситель родамин B в состав нанокомплексов. Следует отметить, что НАФ-ПСК в меньшей степени накапливаются в клетках, т.е. их уровень захвата фагоцитами ниже.

Оценка хронической токсичности НАФ-ПСК показала, что начиная от концентрации 100 мг/мл, наблюдается почти 100% выживаемость фибробластов кожи человека BJ-5ta после 72 ч инкубации (рис. 2в), что сравнимо с цитотоксическими свойствами НАФ-ПЭГ.

Был проведен анализ времени циркуляции НАФ-ПСК в сравнении с НАФ-ПЭГ после внутривенной инъекции мышам Balb/c путем подсчета наночастиц в пробах крови (рис 3а, б). Полученные данные позволяют сделать вывод о почти трехкратном увеличении продолжительности циркуляции по сравнению с ПЭГ–модифицированными НАФ, для которых время циркуляции не превышает 1 ч.

Значительное увеличение времени циркуляции наночастиц в кровотоке способствует эффективному накоплению наночастиц в солидной опухоли за счет EPR-эффекта. Распределение сигнала от НАФ-ПСК в организме мыши с перевитой карциномой легкого Льюиса после введения НАФ-ПСК в ретроорбитальный синус мыши регистрировалось системой эпилюминесцентной визуализации, разработанной во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН [10]. Фотолюминесцентный сигнал в опухоли появлялся через 1 мин после инъекции, через 2–4 мин наблюда-

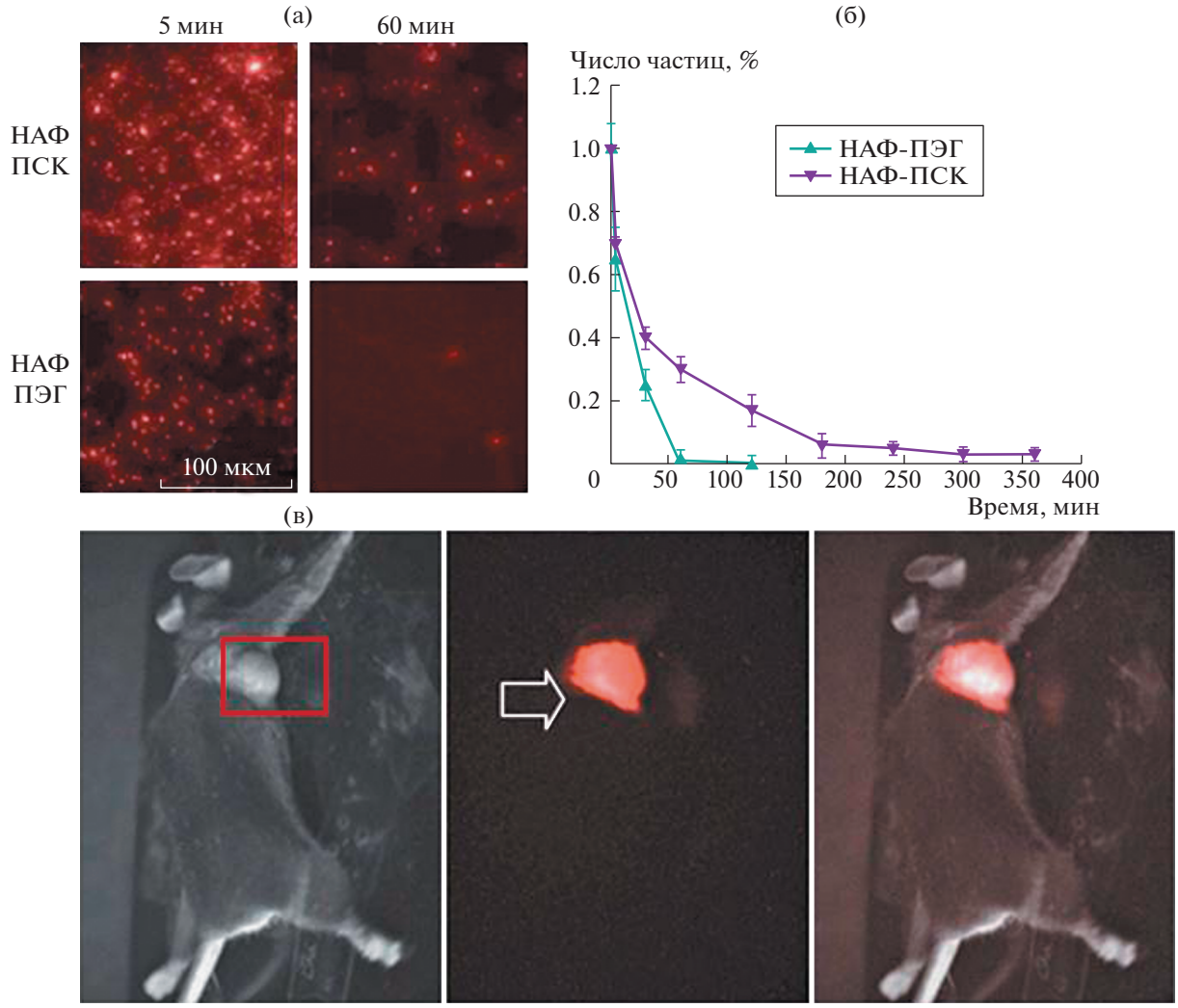

Рис. 3. (а) Фотолюминесцентные изображения образцов крови мыши, взятых с интервалами времени 5 и 60 мин после внутривенной инъекции НАФ-ПЭГ и НАФ-ПСК; (б) Зависимость количества НАФ-ПЭГ и НАФ-ПСК в кровотоке от времени циркуляции наночастиц; (в) *In vivo* изображения мыши Balb/c через 1 ч после введения НАФ-ПСК: левое – светлопольное, центральное – флуоресцентное и правое – наложение изображений.

лось небольшое ослабление сигнала, что связано с частичным выведением наночастиц из кровотока и перераспределением НАФ-ПСК в органах. Максимальный сигнал был достигнут через 1 ч после введения (рис. 3в). Фотолюминесценция НАФ-ПСК в опухоли сохранялась в течение 10 дней.

ВЫВОДЫ

Разработан метод биофункционализации НАФ с использованием полисиаловой кислоты, который позволил получить биореагенты, характеризующиеся низкой адсорбцией белков крови, незначительным захватом макрофагами и низкой цитотоксичностью. Применение ПСК для биофункционализации НАФ привело к увеличению времени циркуляции полученных биореагентов в кровеносной системе до 3 ч, что лежит в основе эффективной доставки и накопления НАФ в опухоли за счет EPR-эффекта. Таким образом, нанокомплексы НАФ-ПСК имеют большой потенциал для использования в качестве агентов биовизуализации, а также носителей для доставки лекарственных препаратов. Предлагаемый метод биофункционализации поверхности с использованием полисиаловой кислоты может быть реализован для различных наночастиц, таких как квантовые точки, магнитные, плазмонные и т.д., для биовизуализации, доставки лекарств и фотосенсибилизаторов в опухоль.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00122 КОМФИ (17-00-00118, 17-00-00119, 17-00-00121).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen G. et al.* Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics // Chemical Reviews. 2014. V. 114. P. 5161–5214. https://doi.org/10.1021/cr400425h
2. *Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E. V.* Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // Advances in Colloid and Interface Science. 2017. V. 245. P. 1–19. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.006
3. *Matsumura Y., Maeda H.* A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs // Cancer Research. 1986. V. 46. P. 6387 – 6392.
4. *Gregoriadis G. et al.* Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. // International Journal of Pharmaceutics. 2005. V. 300. P. 125–130. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.06.007
5. *Rutishauser U.* Polysialic acid at the cell surface: Biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity // Journal of Cellular Biochemistry. 1998. V. 70. P. 304–312. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19980901)70:3<304::AID-JCB3>3.0.CO;2-R
6. *Ilyushin D.G. et al.* Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013. V. 110. P. 1243–1248. https://doi.org/10.1073/pnas.1211118110
7. *Alyatkin S. et al.* The influence of energy migration on luminescence kinetics parameters in upconversion nanoparticles. // Nanotechnology. 2017. V. 28. P. 035401. https://doi.org/10.1088/1361-6528/28/3/035401
8. *Demina P.A. et al.* A versatile platform for bioimaging based on colominic acid-decorated upconversion nanoparticles // Biomaterials science. 2020. V. 8. P. 4570–4580. https://doi.org/10.1039/D0BM00876A
9. *Alexis F. et al.* Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. // Molecular Pharmaceutics. 2008. V. 5. P. 505–515. https://doi.org/10.1021/mp800051m
10. *Khaydukov E. V et al.* Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment // Scientific Reports. 2016. V. 6. P. 35103. https://doi.org/10.1038/srep35103

UPCONVERSION NANOPARTICLES DECORATED WITH POLYSIALIC ACID, FOR SOLID TUMORS VISUALIZATION *IN VIVO*

P. A. Demina[a,c,#], N. V. Sholina[b,c], R. A. Akasov[a,b,c], D. A. Khochenkov[d], A. V. Nechaev[e], I. V. Balalaeva[f], E. V. Khaydukov[c], A. N. Generalova[a,c], and Academician of the RAS S. M. Deev[a]

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

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

[c] *Federal Scientific Research Center "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[d] *FSBSI "N.N. Blokhin National medical research center for oncology" of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

[e] *MTU Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russian Federation*

[f] *Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhnij Novgorod, Russian Federation*

[#]*e-mail: polidemina1207@yandex.ru*

Upconversion nanoparticles (UCNPs) are a promising nanoplatform for bioreagents formation for *in vivo* imaging which emit UV and blue light under the action of near-infrared radiation, providing deep tissues penetration and maintaining a high signal-to-noise ratio. In the case of solid tumors visualization, the UCNP surface functionalization is required to ensure a long circulation time, biocompatibility, non-toxicity. The effective UCNP accumulation in the solid tumors is determined by the disturbed architecture of the vascular network and lymphatic drainage. This work demonstrates an approach for the UCNP biofunctionalization with endogenous polysialic acid for *in vivo* bioreagent formation. Bioreagents possess a low level of nonspecific protein adsorption and macrophage uptake, which allow the prolongation of the circulation time in the bloodstream up to 3 hours. This leads to an intense photoluminescent signal in the tumor.

Keywords: upconversion nanoparticles, biovisualization, surface functionalization, polysialic acid

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 180–184

УДК 577.29

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТОМ ОПУХОЛИ НА РАЗНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ СТАДИЯХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2021 г. А. И. Аутеншлюс[1,2,*], А. А. Студеникина [1,2], Н. А. Вараксин[3], академик РАН В. В. Ляхович[2]

Поступило 27.11.2020 г.
После доработки 01.12.2020 г.
Принято к публикации 02.12.2020 г.

Выявлены различия в продукции цитокинов биоптатами опухоли в зависимости от патологических прогностических стадий The American Joint Committee on Cancer (AJCC) инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ). Пациенты с отсутствием метастазов в сочетании с тройным негативным молекулярным подтипом отличаются по цитокинпродуцирующему ресурсу опухоли IL-18, IL-1β, IL-1Ra, TNF-α, GM-CSF и MCP-1 от пациентов других патологических прогностических стадий.

Ключевые слова: цитокины, рак молочной железы

DOI: 10.31857/S2686738921020037

Цитокины, являющиеся плейотропными молекулами, оказывают влияние на активность опухолевых клеток в зависимости от уровня экспрессии биомаркеров [1]. Большинство исследований, посвященных изучению продукции цитокинов, связанных с риском развития рака молочной железы либо его метастазированием, проводятся на клеточных линиях рака молочной железы [2] или на образцах крови пациентов [3], однако нет исчерпывающей информации и исследований на образцах молочной железы и ее микроокружения у пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ). Сочетание гормонально-рецепторного статуса и анатомических стадий TNM, предложенное в 8 издании комитета The American Joint Committee on Cancer (AJCC) [4], которое по сравнению с 7 изданием позволяет более точно прогнозировать клинические исходы и ответ на лечение у пациентов ИКНТ. Например, селективные модуляторы ER замедляют прогрессирование ER-позитивных и PR-позитивных опухолей [5], а использование в лечении HER2-таргетных препаратов улучшает прогноз у пациентов с его гиперэкспрессией [6]. В нашем исследовании мы изучали продукцию цитокинов в образцах опухолей пациентов, не получавших химио- или лучевую терапию, с последующим сопоставлением цитокинового профиля со стадиями AJCC, полученными после операционного вмешательства, что дает возможность оценить цитокиновый профиль каждой стадии и спрогнозировать степень тяжести заболевания.

Цель исследования – оценить цитокинпродуцирующий ресурс биоптатов больных раком молочной железы на разных патологических прогностических стадиях 8-го издания AJCC 2017 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали образцы опухолей молочной железы 111 пациентов с ИКНТ в возрасте от 23 до 75, средний возраст 56 лет, которым была проведена мастэктомия молочной железы на базе онкологического отделения ГКБ № 1 г. Новосибирска. Неоадъювантная терапия пациентам не проводилась, у них не было обострения очагов хронической инфекции. Сведения о TNM и иммуногистохимических маркёрах предоставлены патологоанатомами. Пациенты были распределены на основе патологической прогностической классификации 8-го издания AJCC и представлены в табл. 1. Все пациенты имели размер опухоли T1-T2 и G2 – умеренную дифференцировку опухоли. Из-за малого количества пациентов, а также наличия лимфогенного метастазирования и боль-

[1] *ФГБОУ ВО "Новосибирский государственный медицинский университет", г. Новосибирск, Россия*
[2] *"Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики" – структурное подразделение ФГБНУ ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск, Россия*
[3] *АО "Вектор-Бест", г. Новосибирск, Россия*
**e-mail: lpciip@211.ru*

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов

8-ed AJCC	T		N				ER		PR		HER2	
	T1	T2	N0	N1	N2	N3	+	–	+	–	+	–
IA $n = 61$	62%	38%	84%	16%	–	–	97%	3%	92%	8%	31%	69%
IB $n = 22$	18%	82%	27%	55%	18%	–	95%	5%	73%	27%	50%	50%
IIA $n = 17$	18%	82%	94%	6%	–	–	6%	94%	–	100%	23%	77%
III $n = 11$	9%	91%	–	45%	18%	37%	27%	73%	36%	64%	45%	55%

Примечание: диаметр опухоли (T), лимфогенное метастазирование (N), экспрессия рецепторов: эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста человека второго типа (HER2).

шего размера опухоли, пациенты IIB стадии (5 пациентов), IIIA стадии (5 пациентов) и IIIC стадии (1 пациент) были объединены в одну группу – III, в которую вошли 11 пациентов.

У пациентов IA стадии средний возраст составил 57 лет (от 35 до 75), у IB – 55 лет (от 23 до 75), у IIA – 57 лет (от 38 до 75), у III – 52 года (от 39 до 69).

Парные образцы опухолей объемом 8 мм^3 получали методом трепанобиопсии из одного участка опухоли, чем обеспечивался их одинаковый клеточный состав, что исключает необходимость определения опухолевых клеток в каждом из образцов. После чего образцы помещали в 2 флакона: в первый – образец для определения спонтанной продукции (СП) цитокинов, инкубировали в питательной среде DMEM-F12 в объеме 1 мл, а во второй – образец для определения индуцированной продукции (ИП) цитокинов, инкубировали в таком же объеме среды с добавлением в нее поликлональных активаторов (ПА): фитогемагглютинина 4 мкг/мл, конканавалина А 4 мкг/мл и липополисахарида 2 мкг/мл) (набор Стимул Бест, “Вектор-Бест”, Россия). Образцы инкубировали 72 ч при 37°C, затем центрифугировали при 900 g 15 мин, в полученном супернатанте оценивали концентрации IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-18, IL-1β, IL-1Ra, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1 с помощью иммуноферментных наборов реагентов производства АО “Вектор-Бест”, Новосибирск. Влияние ПА на продукцию цитокинов биоптатами опухоли оценивали по индексу влияния поликлональных активаторов (ИВПА), выраженного в условных единицах (у.е.) по формуле А/Б, где А – концентрация цитокина при ИП, а Б – концентрация цитокина при СП. Такой подход позволяет получать объективные данные, так как в каждом случае существует свой индивидуальный контроль – спонтанная продукция цитокинов с точно таким же количеством опухолевых клеток, которые находятся в образце ткани молочной железы при культивировании его с поликлональным активатором. Достоверность различий результатов определяли с помощью критерия U Манна–Уитни, используя программный пакет SPSSv17.0 for Windows. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. Результаты исследования представлены как медиана и интерквартильный размах (Me;Q_1-Q_3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о спонтанной и индуцированной ПА продукции цитокинов образцами ткани молочной железы пациентов с ИКНТ, достоверно отличающиеся в зависимости от стадий согласно классификации 8 издания AJCC, представлены в табл. 2.

СП IL-18 у пациентов IIA группы была выше по сравнению с IA и IB группами, кроме того, у пациентов III группы СП этого цитокина выше по сравнению с IA, что отражает роль IL-18 как про-онкогенного цитокина при более злокачественной стадии. СП MCP-1 у пациентов III группы была ниже по сравнению с IA и IIA группами.

У пациентов III группы продукция IL-1β и IL-1Ra при воздействии ПА была низкой по сравнению с группой IA, а стимулированная ПА продукция TNF-α и GM-CSF была ниже у пациентов с ИКНТ IIA по сравнению с пациентами IA группы.

Пациенты с ИКНТ IIA группы отличались низким цитокинпродуцирующим ресурсом по шести цитокинам от пациентов с ИКНТ других групп, что связано как с высокой СП цитокинов, так и со слабым влиянием ПА во IIA группе. Для пациентов с ИКНТ IIA группы характерен низкий ИВПА на продукцию: IL-18 и IL-1Ra по сравнению с IA группой и IL-18, IL-1Ra и TNF-α по сравнению с IA и IB группами (рис. 1), эти цитокины опосредуют активацию внутриклеточных сигнальных путей NF-κB и MAPK, стимулирующих пролиферацию опухоли и ангиогенез [7–9], а также GM-CSF по сравнению с пациентами с ИКНТ других патологических прогностических стадий (рис. 2). Этот цитокин (макрофагальный фактор роста) направляет пролиферацию макрофагов в про-опухолевой фенотип M2 [10]. ИВПА

Таблица 2. Спонтанная и индуцированная ПА концентрация цитокинов (пг/мл) в супернатанте опухоли молочной железы пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), распределенных согласно стадиям AJCC

Цитокины	IA $n = 61$	IB $n = 22$	IIA $n = 17$	III $n = 11$
		СП		
IL-18	42.0 (19.6–102.0)	64.6 (27.0–160.5) pIB-IIA = 0.016	217.3 (57.4–1135.3) pIA-IIA = 0.006	155.2 (43.8–324.0) pIA-III = 0.021
MCP-1	1773.0 (294.3–6160.9) pIA-III = 0.022	1404.0 (383.6–2984.3)	1695.6 (752.4–2664.9) pIIA-III = 0.010	375.4 (167.4–1157.0)
		ИП		
IL-1β	273.1 (51.4–582.5)	253.5 (58.9–562.5)	76.0 (27.2–484.0)	55.1 (20.0–221.1) pIA-III = 0.033
IL-1Ra	6850.9 (2702.2–15325.6)	8853.7 (2799.5–19131.5)	2261.0 (1331.9–16025.0)	2977.1 (1307.2–5407.0) pIA-III = 0.030
TNF-α	16.9 (2.6–53.8) pIA-IIA = 0.020	8.6 (2.1–23.0)	3.1 (1.3–11.8)	3.9 (1.7–33.6)
GM-CSF	86.3 (14.5–194.1) pIA-IIA = 0.019	38.2 (10.0–138.0)	18.7 (4.6–42.9)	35.3 (8.8–346.0)

Примечание: в табл. 2 представлены только те цитокины, по которым имелись статистически значимые различия между стадиями AJCC.

на продукцию MCP-1 пациентов IIA группы был ниже по сравнению с пациентами IA и III групп, MCP-1 в ткани опухоли способствует ангиогенезу и привлекает макрофаги в опухолевый очаг [11]. ИВПА на продукцию IL-1β IIA группы был ниже по сравнению с IA и IB группами.

Отличительной чертой пациентов с ИКНТ III группы был более низкий ИВПА на продукцию IL-1β по сравнению с пациентами IA и IB групп, что обусловлено высокой СП этого цитокина в III группе, который в свою очередь повышает экспрессию MCP-1, что согласно данным литературы, способствует ангиогенезу, миграции и инвазии опухолевых клеток [12].

Высокая гетерогенность продукции цитокинов внутри одной прогностической стадии может

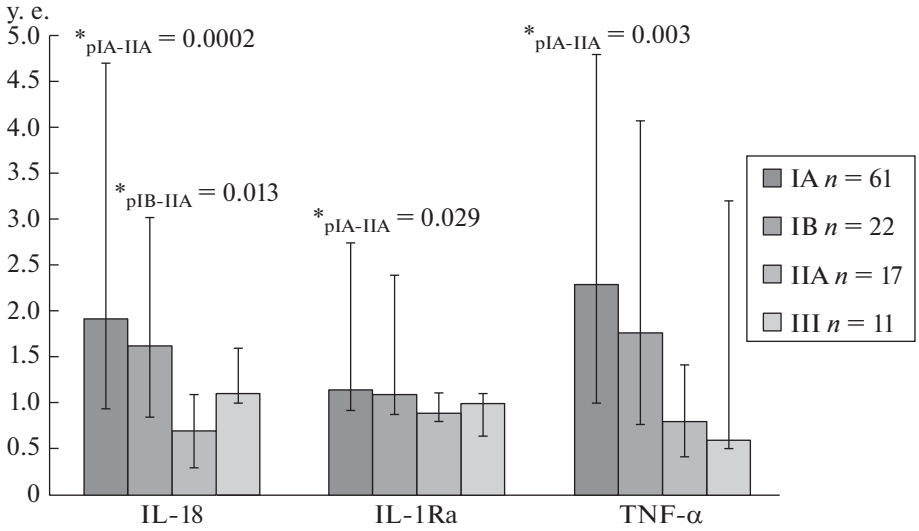

Рис. 1. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-18, IL-1Ra и TNF-α (у.е.) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), распределенных согласно стадиям AJCC.

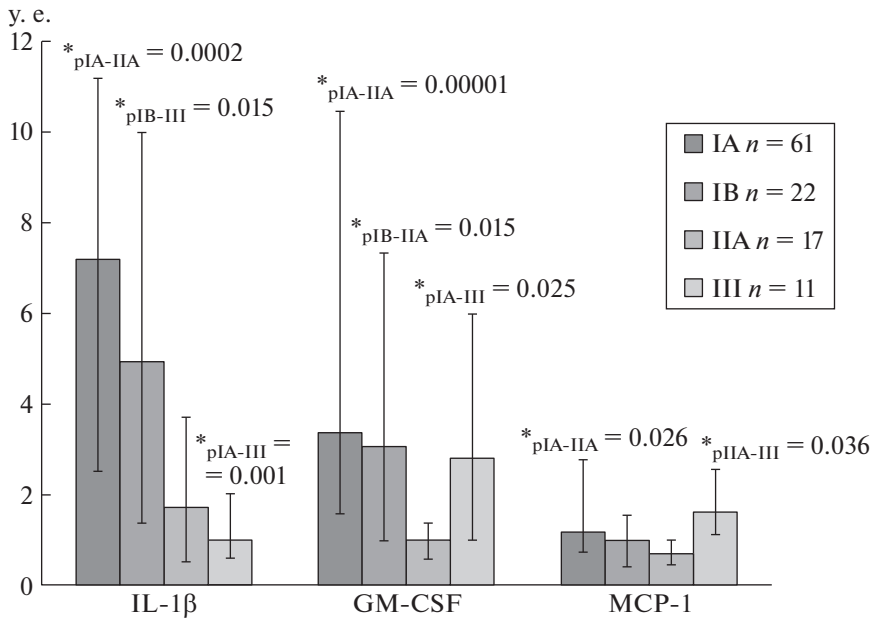

Рис. 2. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию IL-1β, GM-CSF и MCP-1 (у.е.) в супернатантах образцов ткани молочной железы пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа (ИКНТ), распределенных согласно стадиям AJCC.

быть обусловлена несколькими факторами: различной экспрессией рецепторов гормонов и HER2 в рамках одной стадии, возрастными особенностями, а также состоянием иммунной системы у каждого отдельного пациента.

Таким образом, различия в цитокинпродуцирующем ресурсе биоптатов опухоли связаны с патологическими прогностическими стадиями, отражают изменения, происходящие в опухоли и ее микроокружении, и позволяют судить о тяжести опухолевой прогрессии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование исследования за счет государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ АААА-А18-118030790008-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Все лица, участвующие в исследовании, дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gatti-Mays M.E., Balko J.M., Gameiro S.R.* If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer // N.P.J. Breast Cancer. 2019. V. 5. P. 37.
2. *Ortiz-Montero P., Londoño-Vallejo A., Vernot J.P.* Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line // Cell Commun. Signal. 2017 . V. 15. № 1. P.17.
3. *Ma Y., Ren Y., Dai Z. J.* IL-6, IL-8 and TNF-α levels correlate with disease stage in breast cancer patients // Adv. Clin. Exp. Med. 2017. V. 26. № 3. P.421–426.
4. *Gabriel N.H., James L.C., Carl J.D.* // American Joint Committee on Cancer staging manual 8th ed. – N.Y.: Springer. 2017. P. 589–628.
5. *Kast K.* Impact of breast cancer subtypes and patterns of metastasis on outcome // Breast Cancer Res. Treat. 2015. V. 150. № 3. P. 621–629.
6. *Moasser M.M., Krop I.E.* The Evolving Landscape of HER2 Targeting in Breast Cancer // JAMA Oncol. 2015. V. 1. № 8. P. 1154-1161.
7. *Yu P.F., Huang Y., Han Y.Y.* TNF alpha-activated mesenchymal stromal cells promote breast cancer metastasis by recruiting CXCR2 (+) neutrophils // Oncogene. 2017. V. 36. P. 482–490.

8. *Yasuda K., Nakanishi K., Tsutsui H.* Interleukin-18 in Health and Disease // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 3. P. 649.
9. *Baker K.J., Houston A., Brint E.* IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story // Front Immunol. 2019. V. 10. P.1197.
10. *Su S., Liu Q., Chen J.* A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis // Cancer Cell. 2014. V. 25. № 5. P. 605–620.
11. *Kersten K., Coffelt S. B., Hoogstraat M.* Mammary tumor-derived CCL2 enhances pro-metastatic systemic inflammation through upregulation of IL1β in tumor-associated macrophages // Oncoimmunology. 2017. V. 6. № 8. P. e1334744.
12. *Liubomirski Y., Lerrer S., Meshel T.* Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote Pro-Metastatic Chemokines and Aggressiveness Characteristics in Triple-Negative Breast Cancer // Front Immunol. 2019. V. 10. P. 757.

CYTOKINE PRODUCTION BY TUMOR BIOPTATE AT DIFFERENT PATHOLOGICAL PROGNOSTIC STAGES IN BREAST CANCER

A. I. Autenshlyus[a,b,#], A. A. Studenikina[a,b], N. A. Varaksin[c], and Academician of theRAS V. V. Lyakhovich[b]

[a] *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*
[b] *Institute of Molecular Biology and Biophysics – subdivision of Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation*
[c] *JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation*
[#]*e-mail: lpciip@211.ru*

Differences in the production of cytokines by tumor biopsy specimens were revealed depending on the pathological prognostic stages of The American Joint Committee on Cancer (AJCC) of invasive nonspecific breast carcinoma (INBC). Patients with a predominantly absence of metastases in combination with a triple negative molecular subtype differ in the cytokine-producing resource of a tumor of IL-18, IL-1β, IL-1Ra, TNF-α, GM-CSF and MCP-1 from patients with other pathological prognostic stages.

Keywords: cytokines, breast cancer

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 185–189

УДК 577.218

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРОБЛАСТОМЫ IMR32 СОПРОВОЖДАЕТСЯ ГЛОБАЛЬНЫМ ИЗМЕНЕНИЕМ ТРАНСКРИПТОМА

© 2021 г. А. Г. Степченко[1], Т. Н. Порцева[1], академик РАН Ю. В. Ильин[1], член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева[1], Е. В. Панкратова[1,*]

Поступило 11.11.2020 г.
После доработки 07.12.2020 г.
Принято к публикации 09.12.2020 г.

Нейробластома – один из наиболее распространенных видов раковых опухолей у младенцев, при котором часто обнаруживается множественная лекарственная устойчивость. Одним из способов лечения нейробластом является создание условий для их дифференцировки. В этой работе мы провели полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в недифференцированной и дифференцированной *in vitro* линии клеток нейробластомы IMR-32 человека и определили сигнальные пути и биологические процессы, претерпевающие наибольшие изменения при дифференцировке. Полученные результаты показывают, что формируется сложная гетерогенная популяция нервных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. В популяции клеток дифференцирующейся нейробластомы возрастает экспрессия генов, которыми обогащены кортикальные нейрональные прогениторные клетки, одновременно присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры ранних постмитотических нейронов. Клетки дифференцируются в нескольких разных направлениях по типу медиатора синаптической передачи. Одновременно при дифференцировке IMR-32 наблюдается усиление транскрипции генов, подавляющих дифференцировку нервных клеток – *Sox2* и *PROM1*, экспрессия которых в норме *in vivo* подавляется.

Ключевые слова: нейробластома, дифференцировка, полнотранскриптомный анализ

DOI: 10.31857/S2686738921020256

Нейробластома – один из наиболее распространенных видов раковых опухолей у младенцев, возникающая из нейробластов во время эмбрионального развития. Этот рак трудно поддается лечению, часто обнаруживается устойчивость к химиотерапии и является причиной почти 15% смертей от рака у детей. Одним из способов лечения таких опухолей, кроме химиотерапии, является создание условий для активации дифференцировки клеток нейробластомы.

Наша цель – использовать модель дифференцировки нейробластом человека *in vitro* для изучения молекулярных событий и изменений активности различных сигнальных путей, сопровождающих этот процесс. Новые знания о молекулярных путях, регулирующие дифференцировку нейробластомы, могут помочь в разработке инновационных терапевтических подходов и улучшить существующие методы лечения.

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия*

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

Нами был проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в недифференцированной и дифференцированной *in vitro* линии клеток нейробластомы IMR-32 человека и определены сигнальные пути и биологические процессы, претерпевающие наибольшие изменения при индуцированной дифференцировке нейробластомы.

В настоящее время используется несколько способов дифференцировки клеток нейробластомы *in vitro*: стимуляция с помощью BrdU, ретиноевой кислоты, культивирование в бессывороточной среде. В клинике для нейробластом, которые проявляют относительную устойчивость к дифференцировке, индуцированной ретиноидами, ведется поиск дополнительных индукторов [1].

IMR32 относительно устойчива к дифференцировке, индуцированной ретиноевой кислотой, поэтому мы использовали для индукции дифференцировки 5-бром-2'-дезоксиуридин (BrdU). Клеточная линия нейробластомы человека IMR-32 претерпевает заметную дифференцировку в ответ на BrdU [2]. BrdU индуцирует морфологическую дифференцировку, а также увеличение количества потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов [2]. Кроме того, BrdU вызывает повышение со-

держания нейромедиаторов [3]. Клетки IMR-32 приобретают регулируемые секреторные свойства после дифференцировки, индуцированной *in vitro*: они собирают секреторные органеллы "*de novo*" и способны накапливать дофамин и высвобождать нейротрансмиттер в ответ на стимулы. Между дифференцированными клетками формируются специализированные клеточные контакты [4, 3]. Дифференцировка нейронов вызывает активацию Ca^{2+}-каналов [4, 2].

При дифференцировке нейробластомы *in vitro* происходит активации Akt и ERK1/2. Как известно, PI3K-Akt играет важную роль в перестройках цитоскелета, необходимых для дифференцировки [5]. Кроме того, в клетках дифференцированной IMR-32 снижаются уровни экспрессии факторов транскрипции протоонкогена MYCN и c-MYB (c-myb) [6].

Для изучения изменения экспрессии генов при дифференцировке нейробластомы IMR32 (Российская коллекция культур клеток, Институт цитологии, Санкт-Петербург, Россия) было проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-Seq). Были выполнены три независимых биологических повтора для дифференцированной IMR32 и для недифференцированной IMR32. Клетки IMR32 культивировали в среде MEM, содержащей 10% FBS, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Дифференцировку нейробластомы IMR32 проводили в той же культуральной среде при добавлении 2.5 мкМ BrdU в течение 16 дней, среду для культивирования меняли каждые 3 дня.

мРНК выделяли с использованием модуля магнитной изоляции мРНК NEBNext Poly (A) (NEB#E7490). NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina (NEB#E7760) использовали 3 мкг тотальной РНК для создания библиотек для секвенирования. Библиотеки РНК были подготовлены для секвенирования с использованием стандартных протоколов Illumina. Двухцепочечную кДНК, продукты реакции лигирования и продукты реакции ПЦР очищали с использованием гранул AgencourtAMPure XP.

Распределение библиотек кДНК по размеру оценивали после ПЦР (12 циклов) с использованием Agilent BioAnalyzer. Профили мРНК 16-дневной дифференциации клеток нейробластомы IMR32 и недифференцированной нейробластомы IMR32 были получены путем глубокого секвенирования в трех повторах с использованием Illumina NovaSeq. Для каждого образца было получено от 28 до 35 млн прочтений. Картирование полученных последовательностей в геном человека (hg38) выполнялось с использованием программного обеспечения hisat. Полученные данные были использованы для функционального анализа дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), который был проведен с использованием следующих интернет-ресурсов: (GO; DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp): GOTERM BP FAT (биологический процесс) и KEGG Pathway (www.genome.jp/kegg/pathway.html)). Программа DAVID рассчитывает модифицированное точное P-значение Фишера, чтобы выявить обогащение GO или молекулярного пути. В качестве критерия отсечения было выбрано значение $p < 0.01$.

Данные RNA-Seq (доступны в GEO, номер GSE161759) показали, что при дифференцировке нейробластомы IMR32 в течение 16 дней *in vitro* изменяется транскрипция 3748 генов с FDR <0.01 (значение *p*, скорректированное для множественного тестирования). Уровни транскрипции 2482 генов увеличились, тогда как уровни транскрипции 1266 генов снизились.

Анализ ДЭГ (Functional Annotation DAVID Bioinformatic Resourses 6.8) показал, что дифференцировка IMR32 приводит к массированной активации генов, вовлеченных в процессы нейрональной дифференцировки и всех сопровождающих ее событий: генерация нейронов, организацию и формирование синапсов, синаптическую передачу, регуляцию транс-синаптической передачи, клеточную адгезию, регуляцию межклеточной коммуникации. Активация генов при дифференцировке IMR32 не ограничивается исключительно нейроспецифическими процессами, но также затрагивает гены, которые участвуют в органогенезе у приматов (рис. 1).

Анализ полнотранскриптомных изменений при дифференцировке нейробластомы показывает, что в результате формируется сложная гетерогенная популяция нервных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. В популяции клеток дифференцирующейся нейробластомы экспрессируются гены, которыми обогащены кортикальные нейрональные прогениторные клетки: радиальные глиальные клетки и промежуточные клетки-предшественники нейронов коры больших полушарий головного мозга: *FDZ8, HES1, HOPX, PDGFD, PROM1, Sox2, TNC, VIM, ALDOC, BTG2, FABP7, EGR1, FOS, POU3F2, RND* [7]. Например, FABP7 необходим для создания системы радиальных глиальных волокон в развивающемся мозге для миграции незрелых нейронов с целью образования корковых слоев. Понижается экспрессия гена *Pax6*, экспрессия которого *in vivo* подавляется при дифференцировке в промежуточные клетки-предшественники нейронов. Одновременно присутствуют клетки, экспрессирующие маркеры ранних постмитотических нейронов: *NeuroD1, nhlh1, lhx9, POU3F1, MYT1L, lno3, lnoD1, lHx8* [8].

Важно отметить, что нейрональные клетки дифференцируются в нескольких разных направ-

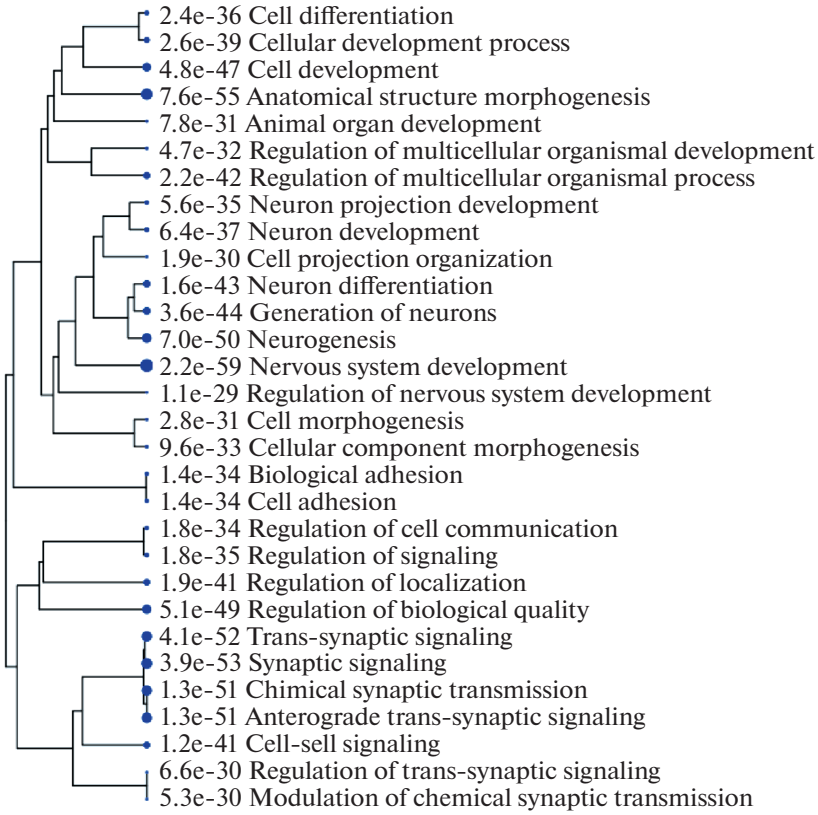

Рис. 1. GO_terms_Tree – 30 наиболее значимых кластеров обогащения дифференциально экспрессирующихся генов. Цифры означают – Log2 p-Value для каждого кластера (биологического процесса).

лениях по типу медиатора синаптической передачи. Формируются серотонинэргические клетки, дофаминэргические клетки, глютаматэргические клетки, GABA-эргические и холинэргические клетки. Дифференцировка IMR32 приводит к увеличению экспрессии генов, которые участвуют в химической синаптической передаче и взаимодействиях нейроактивный лиганд-рецептор.

Дифференцировка IMR32 активирует гены, которые отвечают за взаимодействие нервных клеток друг с другом, с внеклеточным матриксом, а также гены, участвующие в перестройке внеклеточного матрикса. Функциональный анализ генов показал, что согласно DAVID Bioinformatic Resourse 6.8 для активированных генов, изменения происходят в следующих клеточных процессах (GOTEM_BP_DIRECT): организация и разборка внеклеточного матрикса (*HTRA1, TIMP2, TIMP3, BCAN, DCN, ENG, FN1, GSN, KLK4, MMP15, MMP2, MMP10*), адгезия к клеточному матриксу (*COL3A1, COL5A1, COL5A3, COL6A5, COL6A3, COL9A1, COL6A6, ECM2, FBLN5*), интегрины (*ITGA2, ITGA3, ITGA6, ITGA8, ITGA5, ITGB5, ITGA11 и NPNT*), гены, участвующие в катаболических процессах коллагена, в регуляции миграции клеток (KEGG_PATHWAY). Следовательно, дифференцировка IMR32 регулирует динамику фокальной адгезии и миграцию дифференцирующихся нервных клеток.

Дифференцировка нейробластомы IMR32 сопровождается активацией сигнальных путей, которые вовлечены в нейрогенез и регулируют пролиферацию, дифференцировку и выживание нервных клеток (рис. 2а, 2б).

Дифференцировка клеток IMR32 приводит к замедлению клеточных делений и к подавлению экспрессии 1266 генов, большая часть которых связана с клеточным циклом. Значительно подавляется экспрессия генов *E2F1, E2F2, E2F7, c-Myb*. Гены с пониженной регуляцией связаны с такими процессами, как деление клетки, переход G1/S, переход G2/M (GOTEM_BP_DIRECT); клеточный цикл (1.2E-18) и репликация ДНК (6.6E-20) (KEGG_PATHWAY).

Из полученных результатов следует, что нейробластные клетки IMR-32 в процессе дифференцировки *in vitro* приобретают характеристики гетерогенной популяции дифференцирующихся нейронов человека и могут использоваться для изучения экспрессии генов и активации сигнальных внутриклеточных систем в процессе развития.

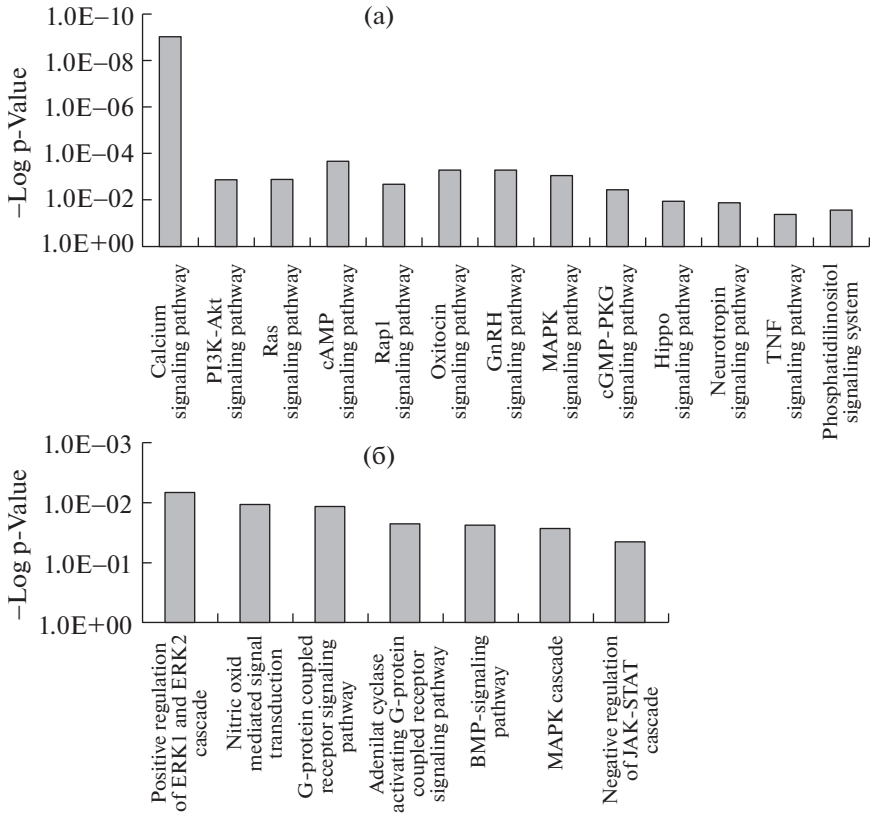

Рис. 2. Функциональный анализ обогащения дифференциально экспрессируемых генов для дифференцированной нейробластомы IMR32. Генная онтология (GO) KEGG Pathway (сигнальные пути) (а) и GOTERM BP FAT (биологический процесс) (б) для активированных дифференциально экспрессирующихся генов.

Однако следует отметить, что при дифференцировке клеток IMR-32 наблюдается усиление транскрипции некоторых генов, экспрессия которых в норме при дифференцировке нейрональных клеток *in vivo* подавляется. Например, увеличивается экспрессия *Sox2*, который сохраняет нервные клетки недифференцированными и подавляет дифференцировку нейронов. Увеличивается экспрессия *PROM1*, который выполняет функцию поддержания свойств стволовых клеток. В клетках нейробластомы PROM1 подавляет клеточную дифференцировку зависимым от RET образом [9].

Таким образом, в гетерогенной популяции дифференцирующихся клеток нейробластомы присутствуют клетки, дифференцировка которых подавляется. Учитывать существование таких клеток в популяции дифференцирующейся нейробластомы важно при разработке тактики лечения и подборе альтернативного комбинированного подхода для пациентов с нейробластомой. Устойчивость таких опухолей к комбинированной терапии может возникать в результате присутствия в популяции низкодифференцированных клеток, которые плохо поддаются дифференцировке и устойчивы к химиотерапии. Важно определить факторы, максимально снижающие в популяции клеток дифференцирующейся нейробластомы экспрессию генов, характерных для кортикальных нейрональных прогениторных клеток.

Также важно отметить, что нейробластомы обычно лечат путем индукции дифференцировки с помощью ретиноевой кислоты (РА), однако, не все нейробластомы хорошо отвечают на индукцию РА. Ретиноевая кислота, также как BrdU, не подавляет экспрессию *Sox2* в клетках IMR-32. Однако эффективным для подавления *Sox2* является оверэкспрессия *PPAR*β/δ. Предполагают, что комбинаторная активация как *RAR*α, так и *PPAR*β/δ может быть подходящей в качестве альтернативного терапевтического подхода для пациентов с резистентной к ретиноидам нейробластомой [10]. Для таких нейробластом необходим поиск дополнительных индукторов. Было предложено использование силденафила [1] и экстракта Tinospora cordifolia [11] для дифференцировки нейробластом, устойчивых к РА. Также использование тидеглусиба для лечения нейробластом [12]

Новые знания о молекулярных путях, регулирующих развитие и прогрессирование нейробла-

стомы, позволят разработать инновационные терапевтические подходы и улучшить существующие методы лечения. Наши результаты могут быть применены для улучшения терапии индукции дифференцировки для пациентов с нейробластомами.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-04-01306) и гранта российского научного фонда (грант №19-14-00365).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dar M.I., Jan S., Reddy G.L., et al.* Differentiation of human neuroblastoma cell line IMR-32 by sildenafil and its newly discovered analogue IS00384. // Cell Signal. 2020. V.65. P. 109425. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109425
2. *Louhivuori L.M., Bart G., Larsson K.P., et al.* Differentiation dependent expression of TRPA1 and TRPM8 channels in IMR-32 human neuroblastoma cells. // J Cell Physiol. 2009. V. 221. P. 67–74.
3. *Gotti C., Sher E., Cabrini D., et al.* Cholinergic receptors, ion channels, neurotransmitter synthesis, and neurite outgrowth are independently regulated during the in vitro differentiation of a human neuroblastoma cell line. // Differentiation. 1987. V. 34. P. 144–155.
4. *Sher E., Denis-Donini S., Zanini A., et al.* Human neuroblastoma cells acquire regulated secretory properties and different sensitivity to Ca2+ and alpha-latrotoxin after exposure to differentiating agents. // J Cell Biol. 1989. V. 108. P. 2291–2300.
5. *Kotapalli S.S., Dasari C., Duscharla D., et al.* All-Trans-Retinoic Acid Stimulates Overexpression of Tumor Protein D52 (TPD52, Isoform 3) and Neuronal Differentiation of IMR-32 Cells. // J Cell Biochem. 2017. V. 118. P. 4358–4369.
6. *Aygun N., Altungoz O.* MYCN is amplified during S phase, and c-myb is involved in controlling MYCN expression and amplification in MYCN-amplified neuroblastoma cell lines. // Mol Med Rep. 2019. V. 19. P. 345–361.
7. *Florio M., Heide M., Pinson A., et al.* Evolution and cell-type specificity of human-specific genes preferentially expressed in progenitors of fetal neocortex. // Elife. 2018. V. 7. P. e32332. https://doi.org/10.7554/eLife.32332
8. *Abranches E., Silva M., Pradier L., et al.* Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. // PLoS One. 2009. V. 4. P. e6286. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006286
9. *Takenobu H., Shimozato O., Nakamura T., et al.* CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. // Oncogene. 2011. V. 30. P. 97–105.
10. *Yao P.L., Chen L., Dobrzański T.P., et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ inhibits human neuroblastoma cell tumorigenesis by inducing p53- and SOX2-mediated cell differentiation. // Mol Carcinog. 2017. V. 56. P. 1472–1483.
11. *Mishra R., Kaur G.* Tinospora cordifolia Induces Differentiation and Senescence Pathways in Neuroblastoma Cells. // Mol Neurobiol. 2015. V. 52. P. 719–733.
12. *Mathuram T.L., Ravikumar V., Reece L.M., et al.* Tideglusib induces apoptosis in human neuroblastoma IMR32 cells, provoking sub-G0/G1 accumulation and ROS generation. // Environ Toxicol Pharmacol. 2016. V. 46. P. 194–205.

DIFFERENTIATION OF IMR32 NEUROBLASTOMA IS ACCOMPANIED BY A GLOBAL CHANGE IN THE TRANSCRIPTOME

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

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

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

Neuroblastoma is one of the most common cancers in infants and is often multidrug-resistant. One of the methods of treating neuroblastomas is to create conditions for their differentiation. In this work, we performed a full-transcriptome analysis of gene expression in an undifferentiated and differentiated *in vitro* human neuroblastoma cell line IMR-32 and identified the signaling pathways and biological processes that undergo the greatest changes during differentiation. The results obtained show that a complex heterogeneous population of nerve cells is being formed at different stages of differentiation. In the cell population of differentiating neuroblastoma, the expression of genes with which cortical neuronal progenitor cells are enriched increases; at the same time, there are cells expressing markers of early postmitotic neurons. Cells differentiate in several different directions according to the type of synaptic mediator. At the same time, during the differentiation of IMR-32 cells, there is an increase in the transcription of genes that suppress the differentiation of nerve cells – *Sox2* and *PROM1*, the expression of which is normally suppressed during *in vivo* differentiation.

Keywords: neuroblastoma, differentiation, full transcriptome analysis

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 190–193

УДК 612.460+612.463

МЕХАНИЗМ УВЕЛИЧЕНИЯ РЕАБСОРБЦИИ ОСМОТИЧЕСКИ СВОБОДНОЙ ВОДЫ В ПОЧКЕ КРЫС ПРИ ОКСИТОЦИНОВОМ САЛУРЕЗЕ

© 2021 г. Академик РАН Ю. В. Наточин[1,*], Е. И. Шахматова[1], А. Е. Боголепова[1]

Поступило 10.12.2020 г.
После доработки 14.12.2020 г.
Принято к публикации 15.12.2020 г.

Найдено экспериментальное решение парадокса увеличения реабсорбции осмотически свободной воды в почке крыс при одновременном возрастании диуреза и салуреза под влиянием окситоцина. Инъекция крысам окситоцина (0.25 нмоль/100 г массы тела) увеличивает диурез с 0.16 ± 0.03 до 0.26 ± 0.02 мл/ч, повышает экскрецию осмотически активных веществ с 134 ± 13.7 до 300 ± 16.3 мкОсм/ч и реабсорбцию осмотически свободной воды, которая коррелирует с выделением окситоцина почкой ($p < 0.001$). Механизм эффекта – окситоцин уменьшает реабсорбцию ультрафильтрата в проксимальном канальце (растет клиренс лития), увеличивается приток жидкости в дистальные участки нефрона. У крыс из вивария высокая осмоляльность мочи (1010 ± 137 мОсмоль/кг H_2O) и концентрация вазопрессина, что обусловливает возрастание реабсорбции осмотически свободной воды. Тем самым окситоцин увеличивает салурез, благодаря чему на фоне высокого уровня эндогенного вазопрессина повышается реабсорбция воды в собирательных трубках.

Ключевые слова: почка, окситоцин, вазопрессин, реабсорбция осмотически свободной воды, салурез

DOI: 10.31857/S2686738921020219

Нонанопептиды нейрогипофиза (окситоцин, вазопрессин) влияют на выделение натрия и воды почкой [1–3]. Окситоцин вызывает натрийурез и увеличивает диурез. Установлено, что вазопрессин способен вызывать натрийурез и увеличивать реабсорбцию осмотически свободной воды в почке млекопитающих. Эти эффекты обусловлены стимуляцией разных подтипов V-рецепторов [2, 4, 5]. В отличие от вазопрессина, у которого выявлено 3 подтипа данных рецепторов, у крысы в геноме найден только один тип окситоцинового рецептора [6]. Высказаны два предположения о молекулярном механизме действия окситоцина на реабсорбцию воды и натрия в почке. Согласно одному из них он стимулирует V_2-рецепторы вазопрессина и повышает реабсорбцию воды [7], а увеличение экскреции натрия объясняется образованием новых форм окситоцина – (OT-GKR) [8]. Наша гипотеза заключается в том, что эффект окситоцина на реабсорбцию воды при действии физиологических концентраций этого гормона можно объяснить, не прибегая к предположению о стимуляции рецепторов других нонапептидов. Задача настоящего исследования – экспериментальное обоснование новой гипотезы физиологического механизма действия окситоцина, исходя из классических представлений о функции почек.

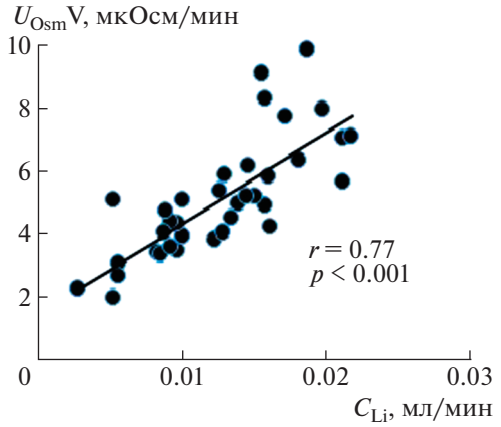

Рис. 1. Корреляция между выведением осмотически активных веществ и клиренсом лития почкой у крыс после инъекции окситоцина. Абсцисса – клиренс лития (C_{Li}), ордината – экскреция осмотически активных веществ ($U_{Osm}V$) после инъекции 0.25 нМ окситоцина ($n = 15$).

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия*
**e-mail: natochin1@mail.ru*

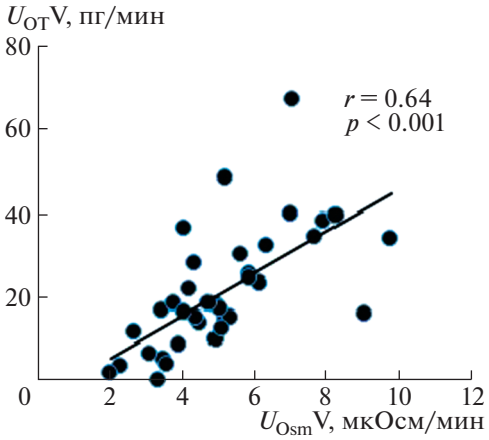

Рис. 2. Корреляция между выведением почкой крыс осмотически активных веществ и окситоцина. Абсцисса – экскреция осмотически активных веществ ($U_{Osm}V$) после инъекции 0.25 нМ окситоцина ($n = 15$), ордината – экскреция окситоцина ($U_{OT}V$).

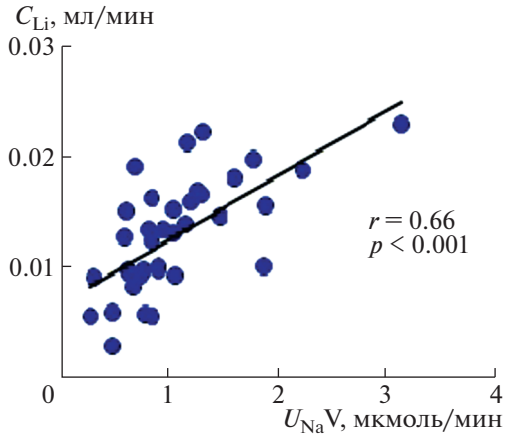

Рис. 3. Корреляция между выведением натрия и клиренсом лития почкой у крыс после инъекции окситоцина. Абсцисса – экскреция натрия ($U_{Na}V$) после инъекции 0.25 нМ окситоцина ($n = 15$), ордината – клиренс лития (C_{Li}).

Эксперименты проведены на самках крыс линии Вистар Rattus norvegicus var. albino весом 200–250 г. Животные получали стандартный гранулированный корм (рецепт ПК-120, ООО “Аллер Петфуд”, Россия) и имели свободный доступ к воде. Утром в день эксперимента крыс не кормили. Содержание животных и проведение экспериментов выполнялось в соответствии с Российскими и международными правилами по работе с лабораторными животными. Во время опыта крыс помещали в индивидуальные клетки-пеналы с проволочным дном, через которое моча стекала по воронке в мерную пробирку. Диурез регистрировали при спонтанных мочеиспусканиях в течение 2 ч. Число животных в каждой серии указано в подписях к рисункам и таблице. Осмоляльность проб сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре Osmo1 (Advanced Instruments, США). Концентрацию натрия и калия в пробах мочи измеряли на пламенном фотометре Sherwood-420 (Sherwood Scientific, Великобритания), а в сыворотке крови – с помощью ионоселективного блока на автоматическом биохимическом анализаторе Erba XL-200 (Lachema, Чехия). Концентрацию лития в моче определяли в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбциометре AA-6200 (Shimadzu, Япония), в сыворотке крови – на пламенном фотометре Sherwood-420. Для измерения концентрации окситоцина и аргинин-вазопрессина (АВП) в пробах мочи использовали наборы для иммуноферментного анализа (Enzo Life Sciences, США). Считывание оптической плотности осуществляли в 96-луночных планшетах по методике тест-системы на автоматическом ридере ELx808 (Bio-Tek Instruments, США). Маркером проксимальной реабсорбции жидкости служил клиренс лития. В виварии крысы в течение 7 дней до эксперимента получали хлорид лития по следующей схеме: в первые 3 дня воду в поилках заменяли на раствор LiCl из расчета 1.5 мг/100 г в сутки, в последующие 4 дня ежедневно инъецировали раствор LiCl по 0.5 мг/100 г в сутки. В экспериментах использовали окситоцин (Sigma-Aldrich, США), LiCl (НеваРеактив, Россия). Показатели функций почек рассчитывали по стандартным формулам на 100 г массы тела животных. Для расчета клиренса осмотически свободной воды ($T^C_{H_2O}$) использовали формулу $T^C_{H_2O} = C_{Osm} - V$, где C_{Osm} – очищение от осмотически активных

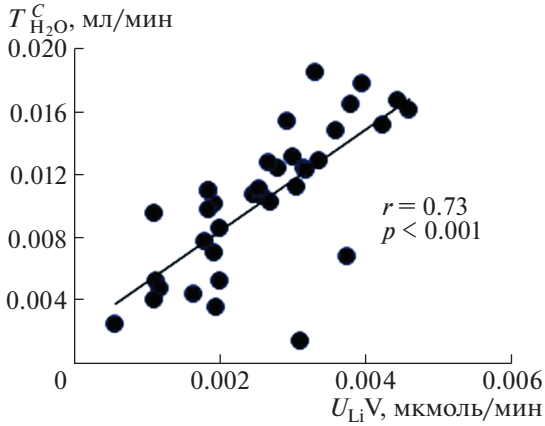

Рис. 4. Зависимость между выведением лития и реабсорбцией осмотически свободной воды в почке у крыс после инъекции окситоцина. Абсцисса – экскреция лития ($U_{Li}V$), ордината – реабсорбция осмотически свободной воды ($T^C_{H_2O}$) после инъекции 0.25 нМ окситоцина ($n = 15$).

Таблица 1. Параметры осморегулирующей функции почки и выведение нонапептидов в течение первого часа после инъекции окситоцина

Параметры функций почек	Контроль, 0.9% NaCl (n = 8)	ОТ 0.25 нМ (n = 15)
V, мл/ч	0.16 ± 0.03	$0.26 \pm 0.02^{\#}$
U_{Osm}, мОсм/кг H_2O	1010 ± 137	1284 ± 89^{NS}
U_{Na}, мкмоль/мл	65.0 ± 18.3	$270.1 \pm 31.2^{\#\#}$
U_K, мкмоль/мл	109.0 ± 23.5	102.9 ± 9.9^{NS}
$U_{Osm}V$, мкОсм/ч	134.0 ± 13.7	$300.3 \pm 16.3^{\#\#}$
$U_{Na}V$, мкмоль/ч	7.8 ± 1.8	$64.6 \pm 8.4^{\#\#}$
U_KV, мкмоль/ч	13.3 ± 2.6	$24.3 \pm 2.5^{\#}$
T^C_{H2O}, мл/ч	0.28 ± 0.04	$0.75 \pm 0.04^{\#\#}$
$U_{OT}V$, пг/ч	175.0 ± 26.8	$1598 \pm 233^{\#\#}$
$U_{AVP}V$, пг/ч	23.0 ± 4.8	29.3 ± 3.1^{NS}

Примечание: окситоцин инъецировали в дозе 0.25 нМ/100 г массы тела. Обозначения: U_{Osm}, U_{Na}, U_K – концентрация в моче осмотически активных веществ, натрия, калия. V, $U_{Osm}V$, $U_{Na}V$, U_KV, T^C_{H2O}, $U_{OT}V$, $U_{AVP}V$ – диурез, выведение осмотически активных веществ, натрия, калия, реабсорбция осмотически свободной воды, выведение окситоцина, АВП. Достоверность к контролю – $^{\#}p < 0.02$; $^{\#\#}p < 0.001$; $^{NS}p > 0.05$.

веществ, а V – диурез. C_{Osm} рассчитывают по данным осмоляльности сыворотки крови и мочи. Все данные представлены в виде $M \pm m$. Сравнение между группами проводили с использованием одно- или двухфакторного дисперсионного анализа и теста Холм-Шидака для попарного сравнения средних, r – коэффициент корреляции Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Инъекция окситоцина в дозе 0.25 нМ/100 г массы тела повышает экскрецию натрия почкой. Проведенные исследования показали, что в диапазоне доз от 0.175 до 0.325 нМ/100 г массы тела окситоцин оказывает практически одинаковый салуретический эффект, что дало основание использовать дозу 0.25 нМ/100 г массы тела для исследования действия окситоцина на выделение воды и ионов почкой. Для выяснения механизма салуретического эффекта окситоцина было изучено соотношение клиренсов осмотически активных веществ и клиренса лития, который характеризует реабсорбцию жидкости в проксимальном сегменте нефрона. Инъекция окситоцина снижает реабсорбцию жидкости в проксимальном сегменте нефрона, параллельно растут клиренс лития и выделение почкой осмотически активных веществ (рис. 1). Это происходит при стабильном уровне клубочковой фильтрации: клиренс креатинина (C_{Cr}) в контроле 0.45 ± 0.03 мл/мин, после введения окситоцина 0.46 ± 0.03 мл/мин. Экскреция окситоцина коррелирует с выделением осмотически активных веществ (рис. 2). Увеличение диуреза было обусловлено выделением ионов натрия, которое коррелирует с повышением клиренса лития (рис. 3), при одновременном возрастании реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 4). Эксперименты проводились на крысах из вивария, в норме находящихся в состоянии антидиуреза и имеющих высокий уровень эндогенного вазопрессина в крови: осмоляльность мочи превышала 1000 мОсмоль/кг H_2O (табл. 1). Вызываемый окситоцином поток большего объема канальцевой жидкости проходит по собирательным трубкам почки, осмотическая проницаемость стенки которых повышена благодаря присутствию в крови вазопрессина.

Возрастание салуреза и диуреза в этих условиях повышало реабсорбцию осмотически свободной воды (рис. 4). Это объясняется тем, что при значительных концентрациях вазопрессина этот гормон стимулирует V_2 -рецепторы клеток собирательных трубок; на фоне снижения проксимальной реабсорбции под влиянием окситоцина и при значительной концентрации эндогенного вазопрессина увеличение потока жидкости по канальцу сопровождается усилением реабсорбции осмотически свободной воды (рис. 4, табл. 1).

Исследование механизма физиологического эффекта окситоцина на функцию почек выполнено на неанестезированных животных, в стандартных по отношению к состоянию функции почек условиях. Выявлен физиологический парадокс – антидиуретическая реакция почек (повышение реабсорбции осмотически свободной воды) при стабильной гломерулярной фильтрации (постоянный клиренс креатинина) происходит в сочетании с увеличением диуреза в ответ на инъекцию окситоцина. Физиологический механизм такого эффекта окситоцина у крыс может быть объяснен следующим образом. Окситоцин стимулирует ОТ-рецепторы в клетках проксимального сегмента нефрона, что снижает проксимальную реабсорбцию жидкости и подтверждается увеличением клиренса лития. Повышается приток жидкости в дистальный сегмент нефрона, в котором окситоцин в использованной дозе стимулирует V_{1a}-рецепторы. Блокада этих рецепторов селективным антагонистом V_{1a}-рецепторов устраняет натрийуретический эффект окситоцина [9]. В итоге снижается реабсорбция ионов в толстом восходящем отделе петли Генле, увеличивается экскреция осмотически активных веществ, растет салурез, диурез и одновременно реабсорбция осмотически свободной воды (табл. 1). Первые два эффекта зависят от введенного окситоцина, а последний от высокого уровня эндогенного вазопрессина, поскольку эксперимент про-

водился на стандартных животных из вивария, у которых значителен уровень эндогенного гормона в крови и, соответственно, в моче (табл. 1).

Таким образом, механизм действия окситоцина на почку, связанный с увеличением экскреции натрия и возрастанием реабсорбции осмотически свободной воды может быть объяснен, исходя из классических представлений о влиянии нонапептидов нейрогипофиза на селективные типы известных рецепторов. Стимуляция окситоциновых рецепторов в проксимальном канальце уменьшает реабсорбцию жидкости, что способствует салурезу, а секреция эндогенного вазопрессина повышает реабсорбцию осмотически свободной воды в собирательных трубках почки.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-15-00358.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Knepper Mark A., Kwon T.H., Nielsen S.* // N. Engl. J. Med. 2015. V. 372. № 14. P. 1349–1358. https://doi.org/10.1056/NEJMra1404726
2. *Bankir L., Bichet D.G., Morgenthaler N.G.* // J. Intern. Med., 2017. V. 282. № 4. P. 284–297. https://doi.org/10.1111/joim.12645
3. *Koshimizu T., Nakamura K., Egashira N., et al.* // Physiol. Rev. 2012. V. 92. № 4. P. 1813–1864. https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2011
4. *Manning M., Misicka A., Olma A., et al.* // J. Neuroendocrinol. 2012. V. 24. № 4. P. 609–628. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02303.x
5. *Natochin Yu.V., Golosova D.V.* // Vitamins and Hormones. 2020. V. 113. P. 239–258. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.08.013
6. *Kutina A.V., Makashov A.A., Balbotkina E.V., et al.* // Acta Naturae, 2020. V. 12. № 1. P. 73–83. https://doi.org/10.32607/actanaturae.10943
7. *Li C., Wang W., Summer S.N., et al.* // J. Am. Soc. Nephrol. 2008. V. 19. № 2. P. 225–232. Epub 2007 Dec 5. https://doi.org/10.1681/ASN.2007010029
8. *Jankowski M., Danalache B., Plante E., et al.* // PLoS ONE. 2019. V. 14. № 7.: e0219205. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219205
9. *Наточин Ю.В., Шахматова Е.И., Боголепова А.Е.* // Бюл. эксп. биол. и мед. 2019. Т. 168. № 11. С. 573–576. https://doi.org/10.1007/s10517-020-04768-y

THE MECHANISM OF THE SOLUTE-FREE WATER REABSORPTION INCREASE IN THE RAT KIDNEY BY OXYTOCIN SALURESIS

Academician of the RAS Yu. V. Natochin[a,#], E. I. Shakhmatov[a], and A. E. Bogolepova[a]

[a] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: natochin1@mail.ru*

We found an experimental solution to the paradox when the reabsorption of solute-free water increases with a simultaneous increase in diuresis and saluresis in the rat's kidney under the oxytocin action. Injection of oxytocin to rats (0.25 nmol/100 g of body weight) increases diuresis from 0.16 ± 0.03 to 0.26 ± 0.02 ml/h , the solutes excretion from 134 ± 13.7 to 300 ± 16.3 μOsm/h and the reabsorption of solute-free water, which correlates with the renal excretion of oxytocin ($p < 0.001$). The mechanism of the effect is that oxytocin decreases the reabsorption of ultrafiltrate in the proximal tubule (the clearance of lithium increases) and increases the fluid flow through the distal segment of the nephron. In vivarium rats, urine osmolality (1010 ± 137 mOsm/kg H_2O) and the concentration of vasopressin are high, this causes an increase in the reabsorption of solute-free water. Thus, oxytocin increases saluresis, which, against the background of a high level of endogenous vasopressin, increases the water reabsorption in the collecting ducts.

Keywords: kidney, oxytocin, vasopressin, reabsorption of solute-free water, saluresis

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 194–198

УДК 616-018, 611.868, 611.84/.88, 612.811.4, 612.861, 612.313.82, 612.897, 612.899, 57.054, 57.017.35, 611.813.3, 611.811.018, 612.822.56

ВЛИЯНИЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАВМАТИЗАЦИИ В ПОЛОСТИ НОСА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА P53 В ГИППОКАМПЕ КРЫС

© 2021 г. И. В. Кастыро[1,*], академик РАН И. В. Решетов[2], Г. В. Хамидулин[1], С. С. Шилин[1], В. И. Торшин[1], М. Г. Костяева[1], В. И. Попадюк[1], Т. Ю. Юнусов[3], П. Е. Шмаевский[1], К. П. Шаламов[1], А. Купрякова[1], Е. С. Дорогинская[1], А. Д. Седельникова[1]

Поступило 28.11.2020 г.
После доработки 13.12.2020 г.
Принято к публикации 15.12.2020 г.

Цель исследования состояла в определении роли стрессорного влияния моделирования септопластики на экспрессию белка p53 в гиппокампе у крыс в условиях сенсорной обонятельной депривации. Моделирование септопластики было проведено на 30 половозрелых крысах самцах. Проводилась количественная оценка апоптоза нейронов в пирамидном слое гиппокампа в субполях CA1, CA2, CA3, зубчатой извилине (DG) на 2-й, 4-й и 6-й день после операции. Гистологические срезы окрашивали иммуногистохимическим методом антителами к белку p53. Увеличение количества p53-позитивный нейронов было отмечено во всех субполях, максимальный рост численности апоптотичных нейронов был отмечен на 4-е сутки после операции. Стрессовое влияние моделирования септопластики у крыс, сопровождающегося сенсорной депривацией периферического отдела обонятельного анализатора, провоцирует экспрессию p53 и запуск механизмов апоптоза в различных субполях гиппокампа.

Ключевые слова: септопластика, стресс, гиппокамп, p53, нейрон, апоптоз, нейрональная ниша

DOI: 10.31857/S2686738921020116

ВВЕДЕНИЕ

Различные физиологические стимулы и патологические нарушения индуцируют образование p53-позитивных нейронов, включая депривацию нейротрофического фактора, гиперактивацию глутаматных рецепторов, гипоксию и ишемию, а также окислительный и питательный стресс, возникающий в результате воздействия окружающей среды, амилоидного β-пептида и оксида азота [1]. p53 активируется внешними и внутренними сигналами стресса, которые и способствуют накоплению в ядрах p53 в активной форме. Ингибиторная активность p53 предотвращает пролиферацию клеток с поврежденной ДНК или с канцерогенным потенциалом. Кроме того, p53 участвует в таких клеточных процессах, как дифференцировка, репарация ДНК и ангиогенез, которые также являются жизненно важными для подавления опухоли [2]. Точные факторы, влияющие на экспрессию p53 с целью запуска апоптоза, изучены лишь частично и являются предметом дальнейшего интенсивного изучения [2].

Обоняние играет важнейшую роль в восприятии внешнего мира крысами. Через обонятельную луковицу нервные импульсы от обонятельных рецепторов идут также частично в гиппокамп, который отвечает за поведенческие акты, память, исследовательскую активность. Ингибирующее действие гиппокампа на паравентрикулярные ядра, которые выделяются в качестве основного интегратора сигналов стресса между таламусом и другими центрами головного мозга [3], сохраняется при помощи относительно ограниченной популяции нейронов в вентральном основании гиппокампа [4]. Поражения в этой области приводят к увеличению высвобождения кортикостерона после стресса [4], что согласуется с контекстно-специфической модуляцией реакций на стресс гиппокампом.

В доступной нам литературе данных о влиянии хирургического повреждения слизистой оболочки полости носа на морфологические изменения нейронов в гиппокампе найдено не было.

[1] *ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия*
[2] *ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия*
[3] *Городская клиническая больница № 40 ДЗМ, Москва, Россия*
**e-mail: ikastyro@gmail.com*

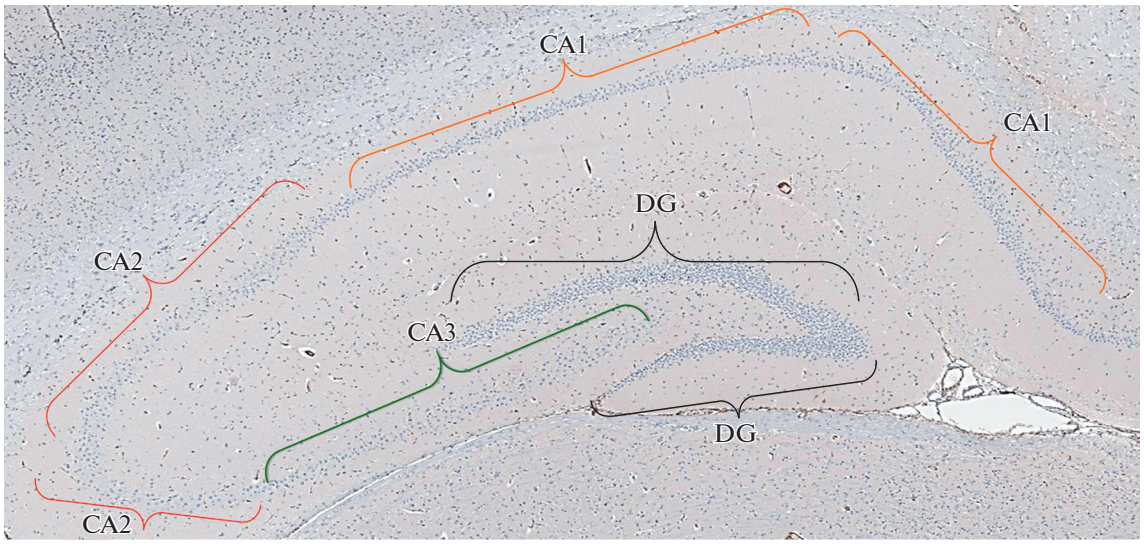

Рис. 1. Расположение субполей гиппокампа крысы. Иммуногистохимическая реакция анти-p53. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. ×100.

Цель исследования: определить роль стрессорного влияния моделирования септопластики на экспрессию белка p53 в гиппокампе у крыс в условиях сенсорной обонятельной депривации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование было проведено на 30 половозрелых крысах-самцах линии Wistar возрастом 12–18 мес. 10 крыс составили контрольную группу. Перед операцией в хвостовую вену вводили раствор золетила (10 мг/кг). При помощи зигзагообразной скарификации слизистой оболочки перегородки носа острым зондом в каудо-краниальном направлении проводили моделирование септопластики. В экспериментальной группе крыс забивали на 2-е, 6-е и 14-е сутки после операции по 10 особей. Фиксацию головного мозга проводили до трепанации черепа путем введения через сердце физиологического раствора, а затем 10% раствора формалина в течение 5–10 мин. После трепанации черепа головной мозг фиксировали 10% раствором формалина, после чего заключали в парафиновые блоки. Получали 4 среза головного мозга во фронтальной плоскости толщиной 4 мкм с каждой крысы и окрашивали препараты методами иммуногистохимии к белку p53. Все срезы докрашивали гематоксилином Майера. Изучали субполя гиппокампа CA1, CA2, CA3 и зубчатую извилину (DG) (рис. 1).

В пирамидном слое субполей на каждом срезе подсчитывали абсолютное количество нейронов, у которых была положительная ядерная реакция с антителами, а также нейрональные ниши. Выделяли нейроны на начальной стадии экспрессии белка p53 (положительная реакция на белок p53 в цитоплазме нейрона, четкое ядро без признаков кариорексиса) и на стадии апоптоза (окрашивание ядра нейрона антителами на белок p53, признаки кариорексиса, узкая полоска гипохромной цитоплазмы). Вычислялись средние значения и стандартные ошибки средней для срезов каждого животного и для группы в соответствующем субполе. Для оценки достоверности различий между группами использовали критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0.05$.

Исследования на животных проводили согласно требованиям “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных” (1984 г.) и “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (1986 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Моделирование септопластики привело к увеличению численности p53-позитивных нейронов во всех субполях гиппокампа у крыс, по сравнению с данными группы контроля (рис. 1). Так, в субполях CA1 и CA2 подобное увеличение наблюдалось на 2-й и 4-й день, а на 6-й день после операции –только в CA1 (рис. 2а, 2б). В субполе CA3 и DG количество p53+ нейронов на ранних стадиях экспрессии было больше, чем в норме на всех сроках, а нейронов с выраженными признаками апоптоза в CA3 – на 2-й и 6-й день, в DG – на 4-й и 6-й день после операции (рис. 2б, 2в).

Колебания количества p53+ нейронов в динамике в каждом слое были следующими. Пик p53-позитивных нейронов на ранних стадиях был отмечен на 4-й день в субполях CA1 и DG ($p < 0.01$).

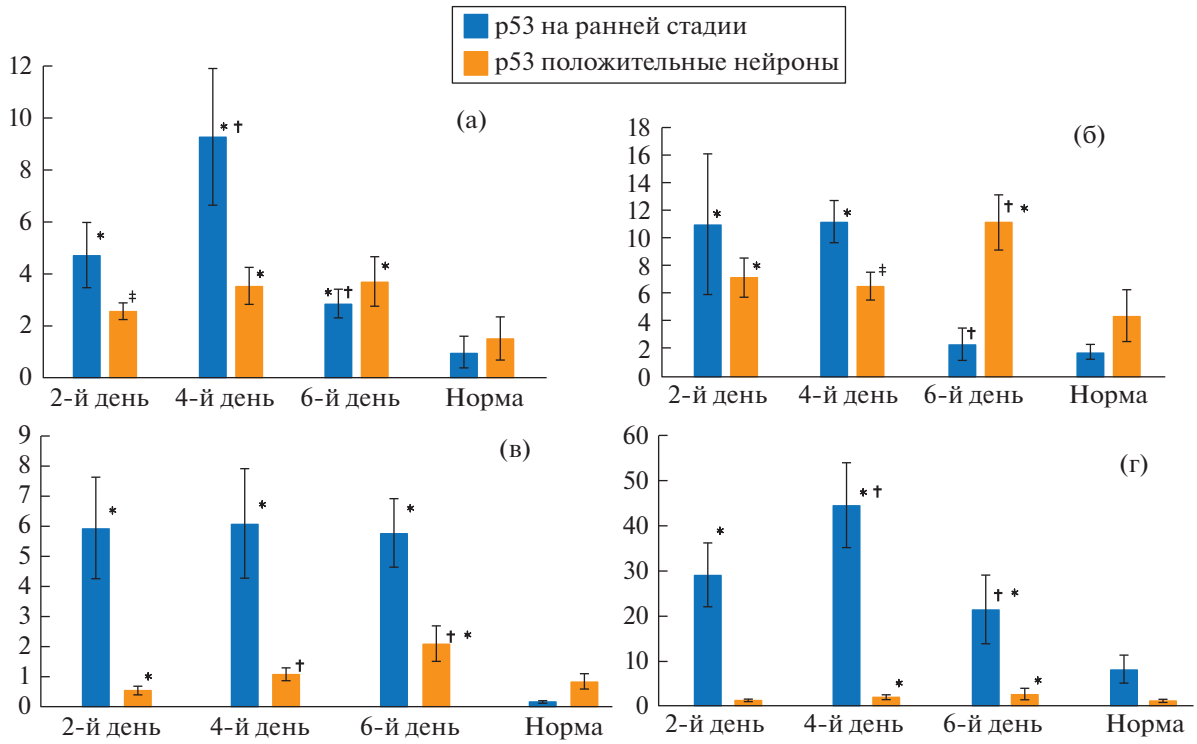

Рис. 2. Изменение количества p53-позитивных нейронов на различных стадиях апоптоза в различные сроки после моделирования септопластики у крыс в зонах гиппокампа CA1 (а), CA2 (б), CA3 (в) и DG (г). † –достоверное различие между сроками наблюдения ($p < 0.01$); * –достоверное различие между данными эксперимента и нормой ($p<0.01$); ‡ – достоверное различие между данными эксперимента и нормой ($p < 0.05$).

Уменьшение этих нейронов к 6-му дню наблюдалось в субполе CA2. В CA3 было зафиксировано их стабильно высокое количество на всех сроках наблюдения ($p < 0.01$). В субполях CA1 (рис. 2а) и DG на 4-й и 6-й дни ($p < 0.01$) отмечалось стойкое увеличение нейронов на поздних стадиях апоптоза. К 6-му дню рост количества этих нейронов был отмечен в субполях CA2 и CA3 ($p < 0.01$). Необходимо отметить, что на 6-й день количество нейронов на поздних стадиях апоптоза было выше, чем нейронов на ранних стадиях экспрессии p53, в субполях CA1 ($p < 0.05$) и CA2 ($p < 0.01$) (рис. 2а, 2b, рис. 3).

Количество нейрональных ниш в зоне CA1 после операции было достоверно выше на 4-й (0.5 ± 0.2) и 6-й (0.6 ± 0.3) дни после операции, по сравнению с группой контроля (0.20 ± 0.07) ($p < 0.01$) и по сравнению со 2-м днем (0.20 ± 0.09) операции ($p < 0.01$). В зоне CA2 была отмечена такая же тенденция, однако наблюдался рост их количества и на 6-й день (5.6 ± 0.0) после моделирования септопластики ($p < 0.05$). В зоне CA3 увеличение нейрональных ниш наблюдалось лишь на 6-й день ($p < 0.01$), но оно было значительное –1.50 ± 0.88, по сравнению с нормой (0.20 ± 0.09) и более ранними постоперационными сроками. В DG была зафиксирована аналогичная картина, что и в зоне CA2: по сравнению с нормой (0.2 ± 0.1), число нейрональных ниш было достоверно выше на четвертый (0.5 ± 0.1) ($p < 0.05$) и шестой (1.0 ± 0.2) дни ($p < 0.01$). Также была отмечена динамика роста нейрональных ниш: их количество возросло на 4-е сутки ($p < 0.05$) и на 6-е сутки ($p < 0.01$), в сравнении с предыдущими сроками анализа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Повышенная экспрессия p53 индуцирует гибель нейрональных клеток даже в отсутствие травмы, ишемии или эксайтотоксичности [5]. На примере эмбрионов мышей было показано, что p53 может защищать нейроны от апоптоза при определенных условиях во время нейрогенеза [6], однако в нейронах взрослых особей p53, как правило, ассоциируют с остановкой клеточного цикла, апоптозом и репарацией ДНК [7]. p53 может также присутствовать в аксональных терминалях, вызывая синаптическую дегенерацию [8].

Экспрессия p53 может быть важной для апоптоза нейронов после ишемии или эксайтотоксичности. Это было доказано в исследованиях, показывающих, что количество p53 в нейронах увеличивается в ответ на эти воздействия [9]. Повышенная экспрессия гена p53 также наблюдалась после экспериментальной черепно-мозговой травмы [10]. Уже через 6 ч после травмы

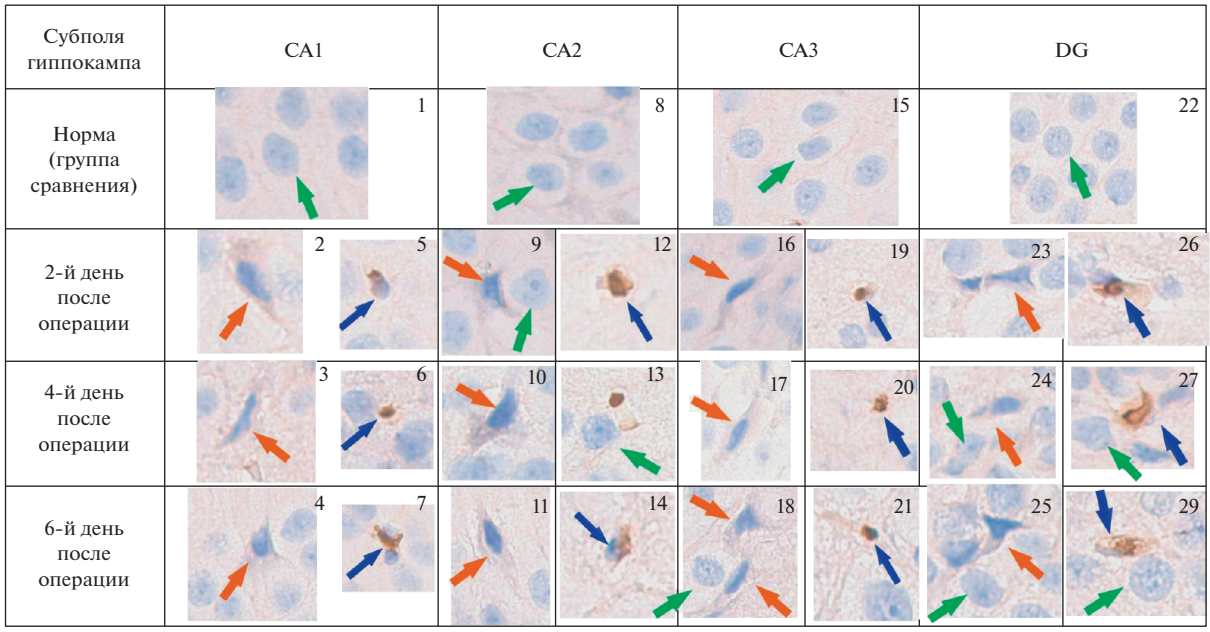

Рис. 3. Экспрессия белка p53 в нейронах гиппокампа крысы после моделирования септопластики: нормальные нейроны (зеленые стрелки), нейроны с начальными проявлениями экспрессии белка p53 (оранжевые стрелки), нейроны на поздних стадиях апоптоза (синие стрелки). Окрашивание антителами к белку p53, докрашивание гематоксилином Майера. Ув. ×600.

мРНК p53 индуцируется преимущественно в нейронах, уязвимых к черепно-мозговой травме, таких как контуженная кора, латеральные и медиальные геникулярные ядра таламуса, а также нейроны в CA3 и DG гиппокампа [11].

В настоящем исследовании показано, что количество p53-позитивных нейронов (рис. 3) и нейрональных ниш в гиппокампе увеличивается на фоне скарификации слизистой оболочки перегородки носа у крыс. Отчетливо видно, что в CA1 и CA2 на 6-й день увеличивается количество нейронов на поздних стадиях апоптоза. Подобные явления в гиппокампе можно объяснить постхирургическим отеком в первые дни, сужением носовых ходов и последующей гипоксией [12]. Многие исследования убедительно доказывают, что p53 участвует в апоптозе нейронов, который наблюдается после инсульта или черепно-мозговой травмы [9]. В предыдущих наших исследованиях было показано, что сенсорная депривация периферической части обонятельного анализатора при септопластике провоцирует выраженные морфофизиологические стрессовые реакции: изменение в балансе вегетативной нервной системы [12], тревожно-депрессивное состояние [13] и вызывает увеличение количества темных нейронов в гиппокампе [14] вследствие нарушения носового дыхания и острого состояния гипоксии у животных. Полученные экспериментальные данные служат убедительным доказательство того, что манипуляции в области перегородки носа приводят к выраженным нейрофизиологическим стрессорным реакциям [12–14]. Это важно для понимания острого постоперационного болевого синдрома, выбора адекватной стратегии его купирования у пациентов, перенесших септопластику, так как проблема профилактики острой боли в хирургической ринологии окончательно не решена [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стрессовое влияние моделирования септопластики у крыс, сопровождающегося сенсорной депривацией периферического отдела обонятельного анализатора, провоцирует экспрессию p53 и запуск механизмов апоптоза в различных субполях гиппокампа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wang D.B., Kinoshita C., Kinoshita Y., Morrison R.S.* p53 and Mitochondrial Function in Neurons // Biochim Biophys Acta. 2014. 1842 (8):1186-97.
2. *Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y.* Apoptosis – the p53 network // Journal of Cell Science. 2003. V. 116. P. 4077–4085.

3. *Swanson L.W., Kuypers H.G.* The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods // J. Comp. Neurol. 1980. V. 194. P. 555–570.

4. *Herman J.P., Mueller N.K.* Role of the ventral subiculum in stress integration // Behav Brain Res. 2006. V. 174. P. 215–24.

5. *Jordan J., Galindo M.F., Prehn J.H.M., Weichselbaum R.R., Beckett M., Ghadge G.D., Roos R.P., Leiden J.M., Miller R.J.* p53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron cultures // J Neurosci. 1997. V. 17. P. 1397–1405.

6. *Armstrong J.F., Kaufman M.H., Harrison D.J., Clarke A.R.* High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice // Curr Biol. 1995. V. 5. P. 931–936.

7. *Tedeschi A., Gi Giovanni S.* The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon // EMBO reports. 2009. V. 10. P. 676–583.

8. *Erster S., Moll U.M.* Stress-Induced p53 Runs a Direct Mitochondrial Death Program: Its Role in Physiologic and Pathophysiologic Stress Responses In Vivo // Cell Cycle. 2004. V. 3 (12). P. 1492–1495.

9. *Miller F.D., Pozniak C.D., Walsh G.S.* Neuronal life and death: an essential role for the p53 family // Cell Death and Differentiation. 2000. V. 7. P. 880–888.

10. *Morrison R.S., Kinoshita Y.* The role of p53 in neuronal cell death // Cell Death and Differentiation. 2000. V. 7. P. 868–879.

11. *Napieralski J.A., Raghupathi R., McIntosh T.K.* The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury // Brain Res. Mol. Brain Res. 1999. V. 71. P. 78–86.

12. *Kastyro I.V., Inozemtsev A.N., Shmaevsky P.E., Khamidullin G.V., Torshin V.I., Kovalenko A.N., Pryanikov P.D., Guseinov I.I.* The impact of trauma of the mucous membrane of the nasal septum in rats on behavioral responses and changes in the balance of the autonomic nervous system (pilot study) // J. Phys.: Conf. Ser. 2020. V. 1611 (012054). https://doi.org/10.1088/1742-6596/1611/1/012054

13. *Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Torshin V.I., Ermakova N.V., Popadyuk V.I.* The Effect of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Behavior in the Open Field and the Autonomic Nervous System of Rats // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020. V. 492. P. 121–123. https://doi.org/10.1134/S1607672920030023

14. *Torshin V.I., Kastyro I.V., Kostyaeva M.G., Eremina I.Z., Ermakova N.V., Khamidulin G.V., Shevtsova S.N., Tsaturova I.A., Skopich A.A., Popadyuk V.I.* The effect of experimental modeling of septoplasty on rat hippocampal cytoarchitectonics // Golova i sheya. Rossijskij zhurnal = = Head and neck. Russian Journal. 2019. V. 7 (4). P. 33–41 (in Russian).

15. *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 // Vestn. Otorinolaringol. 2016. V. 81(3). P. 7–11 (in Russian).

INFLUENCE OF SURGICAL TRAUMA IN THE NASAL CAVITY ON THE EXPRESSION OF p53 PROTEIN IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS

I. V. Kastyro[a,#], Academician of the RAS I. V. Reshetov[b], G. V. Khamidulin[a], S. S. Shilin[a], V. I. Torshin[a], M. G. Kostyaeva[a], V. I. Popadyuk[a], T. Y. Yunusov[c], P. E. Shmaevsky[a], K. P. Shalamov[a], A. D. Kupryakova[a], E. S. Doroginskaya[a], and A. D. Sedelnikova[a]

[a] *Peoples' Friendship University of Russian, Moscow, Russian Federation*

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

[c] *City Clinical Hospital No. 40 of the Moscow Department of Health, Moscow, Russian Federation*

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

The aim of the study was to determine the role of the stressor effect of septoplasty modeling on p53 protein expression in the hippocampus of rats under conditions of sensory olfactory deprivation. Simulation of septoplasty was carried out on 30 sexually mature male rats. A quantitative assessment of the apoptosis of neurons in the pyramidal layer of the hippocampus in the subfields CA1, CA2, CA3, dentate gyrus (DG) on days 2, 4 and 6 after surgery was carried out. Histological sections were stained by the immunohistochemical method with antibodies to the p53 protein. An increase in the number of p53-positive neurons was noted in all subfields; the maximum increase in the number of apoptotic neurons was noted on the 4th day after surgery. The stressful effect of modeling septoplasty in rats, accompanied by sensory deprivation of the peripheral part of the olfactory analyzer, provokes the expression of p53 and the initiation of apoptosis mechanisms in various subfields of the hippocampus.

Keywords: septoplasty, stress, hippocampus, p53 protein, neuron, apoptosis, neuronal niche

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 199–203

УДК 546.100.0УДК 2.3:547.15/17

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПЕПТИДНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ДОКСОРУБИЦИНА НА *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

© 2021 г. А. Н. Позднякова[1,*], Е. Г. Черемных[1], О. Ю. Соколов[1], Н. В. Кост[1], К. В. Шевченко[2], В. П. Шевченко[2], И. Ю. Нагаев[2], Л. А. Андреева[2], академик РАН Н. Ф. Мясоедов[2]

Поступило 05.12.2020 г.
После доработки 31.12.2020 г.
Принято к публикации 03.01.2021 г.

Исследована цитотоксичность доксорубицина (Dox) и его пептидных модификаций Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox. В качестве тест системы использовали *Tetrahymena pyriformis*, что позволило за счет короткого жизненного цикла и высокой скорости размножения инфузорий проследить их реакцию на воздействие токсикантов на протяжении нескольких поколений. Установлено, что пептидная модификация молекулы Dox заметно снижает ее цитотоксические и цитостатические свойства. Модификация Z-Gly-Pro-Dox обладает меньшим цитотоксическим и цитостатическим эффектом по сравнению с Boc-Gly-Pro-Dox. При определении способности препаратов (в концентрации 100 мкМ) препятствовать бактериальному загрязнению проб, показано, что наименьшая степень зарастания была зафиксирована в присутствии Dox (опт.ед. $_{600nm}$ 81.1). Boc-Gly-Pro-Dox также обладал бактериостатическим действием, но менее выраженным (опт.ед. $_{600nm}$ 93.8). Степень зарастания в присутствии Z-Gly-Pro-Dox была близка к показателям дистиллированной воды. Полученные на инфузориях результаты не противоречили данным, полученным при проведении подобных же исследований на мышах.

Ключевые слова: доксорубицин, пептидные производные, Tetrahymena Pyriformis, цитотоксический эффект, цитостатический эффект

DOI: 10.31857/S2686738921020220

Создание селективных лекарственных средств является актуальнейшей задачей современной онкофармакологии. Часто эффективные препараты вызывают угрожающие жизни осложнения, что существенно ограничивает их применение. Так, для одного из этих препаратов – доксорубицина (Dox), была выявлена значительная кардиотоксичность [1–3]. При использовании этого препарата отмечены случаи, когда у больных проявлялись симптомы тяжелой сердечной недостаточности, что могло приводить к смерти пациента [1].

Предполагается, что побочные эффекты таких цитостатиков, как Dox, могут быть снижены путем пептидной модификации их молекул. Известно, что быстро делящиеся опухолевые клетки экспрессируют большее количество пептидаз, в частности, пролиназу, чем нормальные. В нормальных клетках гидролиз амидной связи у пролинсодержащих пептидов маловероятен. Используя эту особенность, можно создавать низкотоксичные пептидные модификации цитостатиков, устойчивые в здоровых тканях и превращающиеся в активные токсичные формы непосредственно в клетках опухоли. Действительно, в работе [4] было показано, что пептиды, содержащие Dox, могут подвергаться в опухолевых клетках протеолизу по связи Pro-Dox. Для исследований в настоящей работе были использованы Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox, синтезированные с использованием известного набора приемов [5, 6].

Цель работы – сравнительный анализ цитотоксичности Dox и его пептидных модификаций Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox на водных простейших *Tetrahymena pyriformis*.

Инфузории *Tetrahymena pyriformis* широко применяются в фармакологии, медицине, ветеринарии и экологии на первом этапе оценки безопасности и/или эффективности различных соединений. *Tetrahymena pyriformis* имеют линейные размеры 50 × 30 мкм и являются удобными объек-

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр психического здоровья (НЦПЗ), Москва, Россия*

[2] *Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт" – ИМГ), Москва, Россия*

**e-mail: fanianastya@gmail.com*

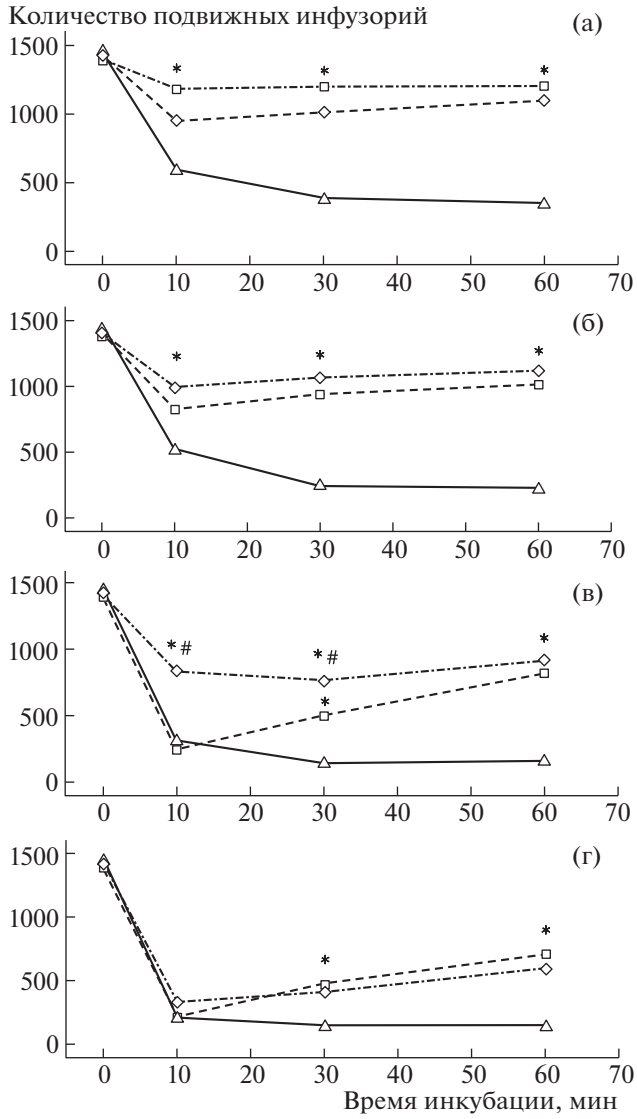

Рис. 1. Острый цитотоксический эффект доксорубицина и его модификаций (▲ – Dox; ■ – Z-Gly-Pro-Dox; ◆ – Boc-Gly-Pro-Dox; * – отличие от доксорубицина, $p < 0.05$; # – отличие от Z-Gly-Pro-Dox, $p < 0.05$): а – при использовании 12.5 мкМ вещества; б – 25 мкМ; в – 50 мкМ; г – 100 мкМ.

тами для исследований ввиду простой постановки опытов, основой которых является подсчет клеток, а также низкой стоимости культивирования, короткого жизненного цикла, позволяющего за счет высокой скорости размножения проследить их реакцию на воздействие токсиканта в ряду поколений за короткое время (6–96 ч). При этом показано, что результаты, полученные на инфузориях, имеют высокий коэффициент корреляции с данными подобных же исследований на мышах, крысах, кроликах и других животных [7–9].

Особенно ценным для данной работы было то, что с помощью инфузорий возможна оценка цитотоксичности не только водорастворимых соединений, но и соединений, растворимых в воде с добавлением дополнительного растворителя. Пробы не растворимых в воде препаратов Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox получены в виде водных эмульсий с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО). Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox растворяли в 3% водном растворе ДМСО. Предварительные эксперименты показали, что ДМСО в указанной концентрации не оказывал никакого влияния на жизнедеятельность инфузорий.

Инфузории *Tetrahymena pyriformis* из собственной коллекции штаммов ФГБНУ НЦПЗ культивировались при стабильной температуре 25°С на стерильной 4-х компонентной среде: 1% пептон, 0.5% глюкоза, 0.2% дрожжевой экстракт, 0.1% хлористый натрий. На четвертые сутки после пересева на свежую среду инфузории использовали

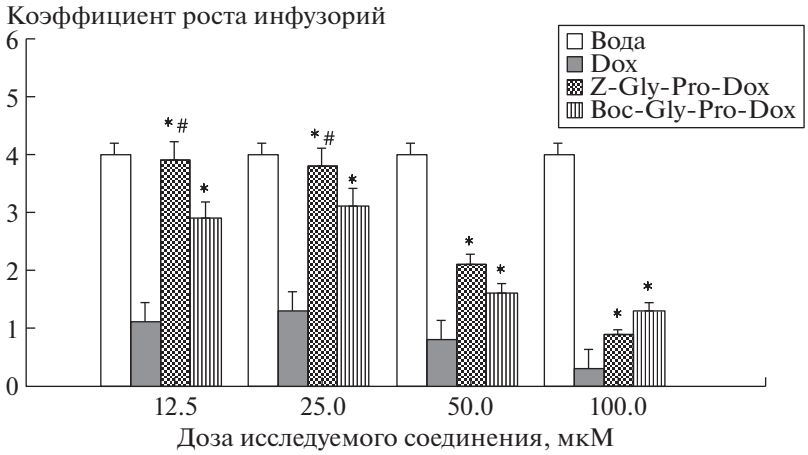

Рис. 2. Цитостатический эффект доксорубицина и его модификаций в зависимости от дозы вещества (* – отличие от доксорубицина, $p < 0.05$, # – отличие от Z-Gly-Pro-Dox, $p < 0.05$) (по оси ординат – коэффициент роста инфузорий; по оси абсцисс – доза исследуемого соединения, мкМ).

в опытах. Оценивали общее количество подвижных клеток в пробах при действии различных концентраций исследуемых веществ: от 10 до 100 мкМ. Каждую пробу оценивали в 3 повторениях, результат усредняли. В работе использовали автоматический анализатор БиоЛаТ (ГОСТ 31674-2012). Прибор БиоЛаТ [10] представляет собой оптико-механическое устройство, позволяющее вводить изображения лунок (емкости диаметром 10 и 15 мм) в компьютер и обрабатывать с помощью специальной программы AutoCiliata. Особенностью алгоритма подсчета клеток является оценка только подвижных объектов, которая основана на свойствах инфузорий этого вида – непрерывно двигаться, т.е. если организм жив – он движется. Общий алгоритм биотестирования состоит в циклическом подсчете инфузорий во всех лунках с пробами. На основании произведенных подсчетов инфузорий по каждой пробе вычисляли относительные количества выживших тест-организмов и проводили сравнительный анализ токсичности Dox и его модификаций Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox.

На первом этапе проводили два вида тестирования:

– острый опыт (10–30–60 минут), определяли концентрации препаратов, при которых происходит гибель и/или снижение подвижности 50% клеток в опыте (EC50) по сравнению с контролем – дистиллированной водой (цитотоксический эффект).

– хронический опыт (24 ч), определяли концентрации препаратов, при которых происходит снижение прироста популяции на 50% по сравнению с контролем (IC50) – дистиллированной водой (цитостатический эффект).

В остром опыте было установлено, что все три препарата дозозависимо снижают подвижность инфузорий. Самой высокой цитотоксичностью обладал немодифицированный Dox (EC50 < 10 мкМ), наименьшей Z-Gly-Pro-Dox (50 < EC50 < 100 мкМ), Boc-Gly-Pro-Dox занимал промежуточное положение (25 < EC50 < 50 мкМ) (рис. 1).

Интересно отметить, что клетки реагировали на введение Z-Gly-Pro-Dox и Boc-Gly-Pro-Dox резким снижением подвижности (точка 10 мин), которая затем частично восстанавливалась. Эффект был дозозависимым. Для немодифицированного Dox он не отмечался.

В суточном тесте ингибирование роста популяции клеток инфузорий, по сравнению с контролем (дистиллированной водой), наибольшим цитостатическим эффектом обладал Dox (IC50 < < 10 мкМ), соответствующий эффект Boc-Gly-Pro-Dox и Z-Gly-Pro-Dox оказался достоверно ниже (IC50 38 ± 4 и 50 ± 5 мкМ соответственно) (рис. 2).

На втором этапе изучали отдаленные цитотоксические эффекты препаратов. На пятые сутки культивирования определяли способность препаратов (в концентрации 100 мкМ) препятствовать спонтанному бактериальному загрязнению проб. По данным сравнительной турбидиметрии, наименьшая степень зарастания была зафиксирована в присутствии нативного Dox (опт.ед.$_{600nm}$ 81.1). Boc-Gly-Pro-Dox также обладал бактериостатическим действием, но менее выраженным (опт.ед.$_{600nm}$ 93.8). Степень зарастания в присутствии Z-Gly-Pro-Dox была близка к показателям дистиллированной воды (опт.ед.$_{600nm}$ 105.2 и 111.2 соответственно).

На заключительном этапе изучили токсичность исследуемых веществ на мышах. Беспород-

Таблица 1. Определение токсичности доксорубицина и его пептидных модификаций на мышах

Соединение	Доза, мкг/кг	Количество животных			LD50, мкг/кг
		Всего	Выжило	Погибло	
Dox	15	4	3	1	16 ± 2
	25	4	0	4	
	50	4	0	4	
Z-Gly-Pro-Dox	15	4	4	0	>50
	25	4	4	0	
	50	4	3	1	
Boc-Gly-Pro-Dox	15	4	4	0	>50
	25	4	4	0	
	50	4	3	1	

ным самцам (возраст 6 мес, вес 20–25 г) однократно вводили внутрибрюшинно Dox и его пептидные модификации. Затем в течение 14 дней фиксировали гибель животных (табл. 1). Дозу LD50 рассчитывали по методу Кернера. Тестирование на мышах подтвердило низкую токсичность Boc-Gly-Pro-Dox и Z-Gly-Pro-Dox. LD50 нативного Dox составило 16 ± 2 мкг/кг, а для обеих модификаций LD50 оказалось выше 50 мкг/кг.

В результате проведенного исследования впервые при использовании тест-системы, основанной на использовании инфузорий *Tetrahymena pyriformis,* показано, что пептидная модификация молекулы антрациклинового антибиотика Dox снижает ее цитотоксические и цитостатические свойства. При этом можно отметить заранее не предсказуемый дозозависимый эффект, наблюдаемый при добавлении пептидных производных Dox, который заключался на первом этапе в резком снижении подвижности клеток, которая затем частично восстанавливалась (для немодифицированного Dox он не отмечался). Это, по-видимому, может указывать на то, что со временем при взаимодействии производных Dox с клетками инфузорий *Tetrahymena pyriformis* за счет пептидной компоненты действие Dox-фрагмента может быть выведено из процессов, влияющих на подвижность клеток и тем самым частично восстановить их жизнедеятельность. Модификация Z-Gly-Pro-Dox обладает меньшим цитотоксическим и цитостатическим эффектом по сравнению с Boc-Gly-Pro-Dox. Но, так как эти различия не велики, а как показали исследования [11], синтезированный Boc-Gly-Pro-Dox легче проникает через искусственные мембраны и более устойчив к действию пролиназы из клеток флавобактерий (Sigma-Aldrich, США), чем Z-Gly-Pro-Dox, оба этих соединения являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований на опухолевых клетках. На это же указывают и данные, полученные и при изучении токсичности исследуемых веществ на теплокровных животных.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами Директивы ЕС 2010/63/EU. Протокол исследования был одобрен Этической комиссией НЦПЗ (протокол № 26 от 16.12.2019 г.)

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работу проводили по плановому госзаданию № АААА-А19-119022590101-1, по теме: “Исследование структуры и функции природных пептидов с целью создания новых лекарственных препаратов, оптимизация структуры кандидатных пептидов, разработка схем синтеза, включая получение меченных дейтерием и тритием физиологически активных соединений”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Семенова А.И.* // Практическая онкология. 2009. Т. 10. № 3. С. 168–176.
2. *Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., et al.* // Pharmacol. Rev. 2004. V. 56. № 2. P. 185–229.
3. *Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., et al.* // J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. V. 52. № 6. P. 1213–1225.
4. *Huang S., Fang R., Xu J., et al.* // J. Drug Targeting. 2011. V. 19. № 7. P. 487–496.
5. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов. Москва, изд-во Мир 1965.
6. *Гершкович А.А., Кибирев В.К.* Химический синтез пептидов. Киев, изд-во Наукова Думка. 1992.
7. *Богдан А.С.* // Вопросы питания. 1983. № 1. С. 62–65.
8. *Богдан А.С.* // Материалы объединенного Пленума Республиканской проблемной комиссии по гигиене и Правления научного общества гигиенистов.

Под ред. Филонова В.П., Соколова С.М. Минск: Республиканский центр гигиены и эпидемиологии. 2000. С. 106–107.

9. *Зарицкая Е.В., Полозова Е.В., Богачева А.С.* //Гигиена и санитария. 2017. Т. 96. № 7. С. 671–674.

10. *Черемных Е.Г., Покатаев А.С., Гридунова В.Н.* Прибор для биологических исследований // Патент РФ № 2361913, 2009. Бюл. № 20.

11. *Шевченко В.П., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., и др.* // Доклады академии Наук. 2019. Т. 488. № 6. С. 682–684.

ASSESSMENT OF THE CYTOTOXICITY OF PEPTIDE MODIFICATIONS OF DOXORUBICIN ON *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

A. N. Pozdnyakova[a,#], E. G. Cheremnykh[a], O. Yu. Sokolov[a], N. V. Kost[a], K. V. Shevchenko[b], V. P. Shevchenko[b], I. Yu. Nagaev[b], L. A. Andreeva[b], and Academician of the RAS N. F. Myasoedov[b]

[a] *The Mental Health Research Center (MHRC), Moscow, Russian Federation*

[b] *Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute" (NRC "Kurchatov Institute" – IMG), Moscow, Russian Federation*

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

The cytotoxicity of doxorubicin (Dox) and its peptide modifications Z-Gly-Pro-Dox and Boc-Gly-Pro-Dox were studied. *Tetrahymena pyriformis* was used as a test system, which made it possible, due to the short life cycle and high reproduction rate of ciliates, to trace their response to the effects of toxicants over several generations. It has been found that peptide modification of the Dox molecule markedly reduces its cytotoxic and cytostatic properties. The Z-Gly-Pro-Dox modification has less cytotoxic and cytostatic effect compared to Boc-Gly-Pro-Dox. When determining the ability of drugs (at a concentration of 100 μM) to prevent bacterial contamination of samples, it was shown that the smallest degree of overgrowth was recorded in the presence of Dox (OD_{600nm} 81.1). Boc-Gly-Pro-Dox also had a bacteriostatic effect, but less pronounced (OD_{600nm} 93.8). The degree of overgrowth in the presence of Z-Gly-Pro-Dox was close to that of distilled water. The results obtained on ciliates did not contradict the data obtained when conducting similar studies on mice.

Keywords: doxorubicin, doxorubicin derivatives, Tetrahymena Pyriformis, cytotoxic effect, cytostatic effect

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 204–208

УДК 57.016.4, 57.054, 57.033, 612.215.4, 612.784, 612.789.2, 612.789.4, 612.782.4, 616.28-76

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ СЛУХОПРОТЕЗИРОВАНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ПЛОЩАДИ АКУСТИЧЕСКОГО ПОЛЯ ГЛАСНЫХ

© 2021 г. А. Н. Коваленко[1], И. В. Кастыро[1,*], Академик РАН И. В. Решетов[2], В. И. Попадюк[1]

Поступило 15.10.2020 г.
После доработки 02.01.2021 г.
Принято к публикации 03.01.2021 г.

Был использован метод преобразования акустических треугольников гласных звуков (АТГ) /а/, /и/, /у/ для объективной оценки акустических особенностей гласных в речевой продукции 20 лиц с длительным нарушением слуха (ДНС). Проводилось для каждого испытуемого логарифмирование значений двух первых формант каждого гласного (logF1, logF2). АТГ преобразовывались в прямоугольные треугольники, вершины звука /у/ которых были перемещены в начало координат, а катеты совмещены с осями координат. У пациентов с ДНС, как правило, уменьшались размеры треугольников, и они растягивались вдоль одной из осей, что, вероятно, имеет зависимость не только от тяжести снижения слуха, но и от длительности слухопротезирования. Представленный подход к нормализации АТГ позволяет выделить как минимум три группы людей с ДНС: в первой группе треугольники гласных вытянуты вдоль оси logF1, во второй – треугольники гласных вытянуты вдоль оси logF2, в третьей – АТГ симметричны.

Ключевые слова: акустическое поле гласных, глухие, логарифмическое преобразование

DOI: 10.31857/S2686738921020141

ВВЕДЕНИЕ

Нормальный голос обладает достаточным тембральным, звуковысотным и динамическим диапазоном, а также способен к гибкому изменению этих характеристик [1]. Различные нарушения голоса и речи характеризуются пониженной громкостью голоса и нарушенной артикуляцией гласных звуков [2]. Потеря слуха является серьезным фактором, искажающим нормальные параметры голоса и вызывающим его нарушения [3]. Даже при наличии здоровых дыхательной системы, гортани и органов артикуляции люди с потерей слуха имеют заметные дефекты голосообразования и фонационного оформления речи [4]. Длительное нарушение слуха (ДНС) или его полное отсутствие влечет за собой системное нарушение речи вследствие принципиально различных процессов.

Площадь акустических треугольников гласных звуков (АТГ) является акустическим параметром, который доказал свою эффективность в количественной оценке артикуляторных особенностей взрослых с психологическими и неврологическими расстройствами [5, 6]. На площадь АТГ влияют проблемы со стороны артикуляционной подсистемы, нарушение слуха, поскольку слух обеспечивает необходимую обратную связь для контроля над речевой деятельностью, а пространство гласных при этом часто отличается уменьшением размеров [7].

Несмотря на значительное количество научной литературы, касающейся АТГ звуков, существует мало исследований, которые посвящены речи русскоговорящих взрослых людей с ДНС.

Цель исследования: определить роль слухопротезирования и его длительности на конфигурацию АТГ и их площадь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группа пациентов состояла из 20 участников (10 женщин и 10 мужчин в возрасте от 23 до 38 лет) с сенсоневральной тугоухостью без сопутствующих расстройств со степенью III, IV и глухота. Все они, за исключением одного мужчины, сообщили, что у них опыт использования слухового аппарата составлял не более 1 года или их не использовали. Контрольную группу составил 31 участник (16 женщин и 15 мужчин, от 20 до 32 лет) с нормальным слухом. Пороговые уровни

[1] *ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов", Москва, Россия*
[2] *ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия*
**e-mail: ikastyro@gmail.com*

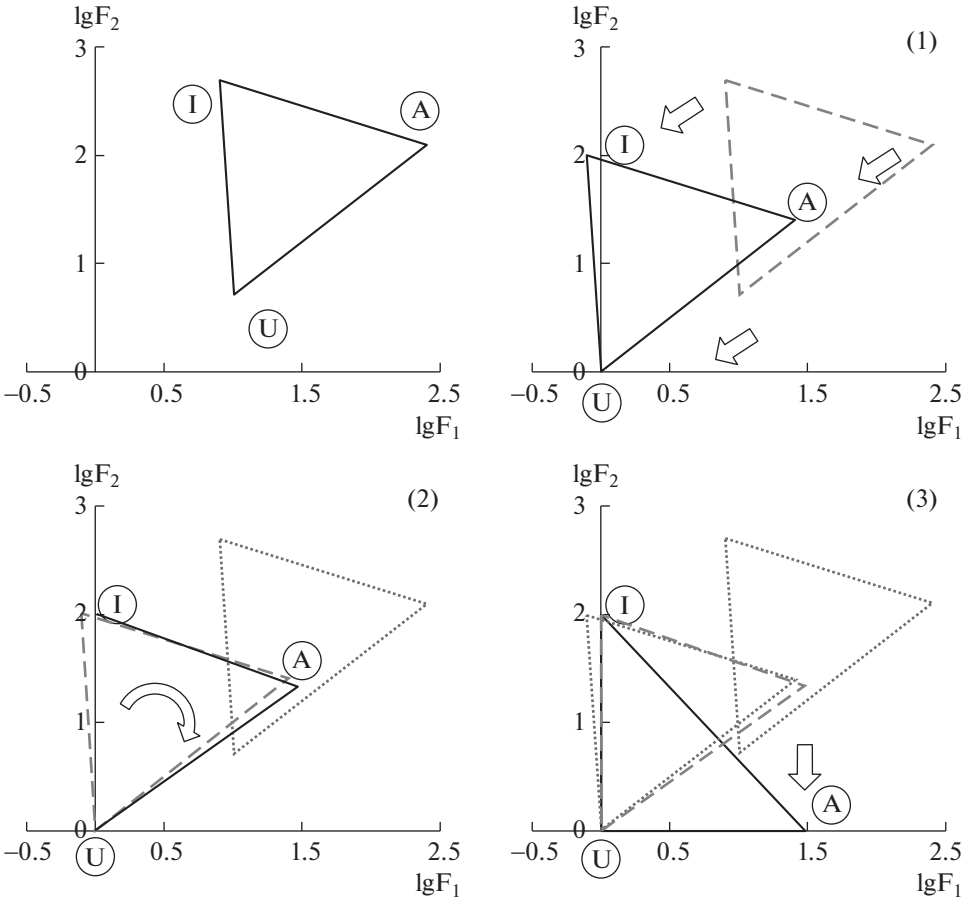

Рис. 1. Схематическое представление трех шагов преобразования акустического треугольника гласных.

слуха на речевых частотах у пациентов измеряли с помощью клинического аудиометра (AA220, Interacoustics/Denmark) с оценкой уровня слышимости звука на 500, 1000, 2000 и 4000 Гц. Для представления среднего порога слуха для каждого субъекта пороги слуха для обоих ушей на всех частотах были усреднены. Все испытуемые длительно произносили русские кардинальные гласные /а/, /и/ и /у/ на комфортном уровне интенсивности голоса. Запись голоса производилась с использованием конденсаторного кардиоидного микрофона на расстоянии 30 см от рта до микрофона (Behringer C-1, Behringer/Germany). Для расчета формант гласных F1 и F2 использовали 3 сек из среднего сегмента аудиозаписей после их обработки с помощью программного обеспечения PRAAT. Значения формант были преобразованы в десятичный логарифм (log) и использованы для построения АТГ и их дальнейшего преобразования.

Преобразование АТГ. Начало координат совмещали с углом звука /у/ АТГ. Производили поворот системы кородинат, который совмещал ось logF2 со стороной треугольника /u/-/i/. Размещали вершины звука /а/ треугольника АПГ на оси logF1 (рис. 1).

Подобное преобразование сохраняет площади исходных АТГ и одновременно придает двум другим его параметрам – евклидову расстоянию между вершинами /u/ и /i/ и евклидову расстоянию между вершиной /а/ и отрезком /u/–/i/ – более простой и ясный вид. Первый параметр определяется относительно новой системы координат как logF2i', а второй – как logF1a'. Площадь АТГ вычисляется при этом простым умножением этих значений, а logF2i'/logF1a' является мерой симметрии АТГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Преобразованные АТГ показаны на рис. 2 в сравнении с данными Lejska M. [4]. По конфигурации акустических треугольников гласных среди пациентов было условно выделено три группы. В первую группу вошли 7 пациентов с тяжелой сенсоневральной тугоухостью (от III степени потери слуха до глухоты) без слухопротезирования или с небольшим сроком использования слуховых аппаратов (от 2 до 3 мес).

У этих пациентов площадь АТГ была очень мала – 0.015 ± 0.009 (на рис. 2 АТГ отмечен красной

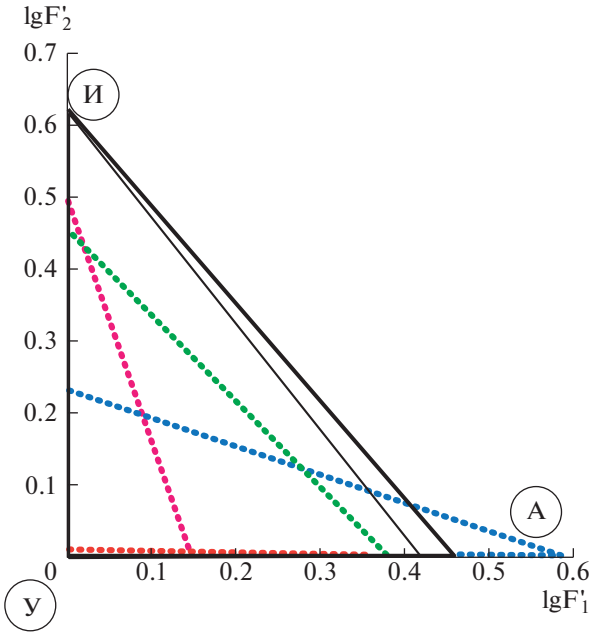

Рис. 2. Преобразованные АТГ. Пунктирные линии: красная – пациенты с тяжелым ДНС, розовая и синяя – пациенты со средним сроком слухопротезирования, зеленая – пациенты с длительным сроком слухопротезирования; тонкая сплошная линия – здоровые люди, жирная сплошная линия – данные других авторов [9].

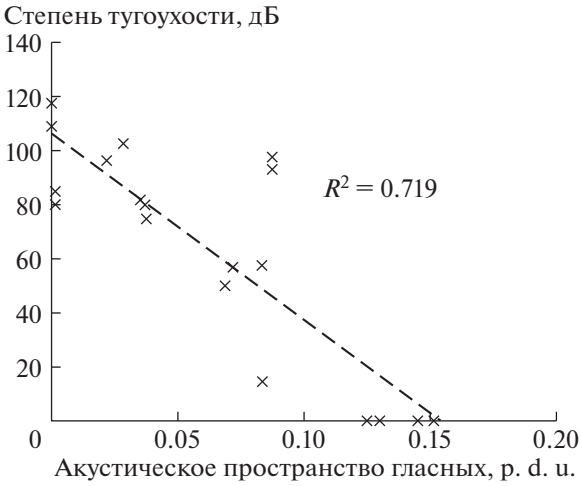

Рис. 3. Зависимость между степенью снижения слуха и площадью АТГ.

пунктирной линией). Так, у двух женщин этой группы среднее значение потери слуха по речевым частотам с двух сторон было 115 и 120 дБ, соответственно, а площади АТГ были настолько маленькие (0.002 и 0.0001 соответственно), что эти треугольники почти не были видны на графике.

Вторую группу составили пациенты (5 человек) со степенью нарушения слуха от II до III. АТГ этой группы приближался по своей конфигурации к треугольнику здоровых людей. Площадь АТГ 2 группы составила 0.062 ± 0.01, а у одного пациента, который длительное время пользовался слуховыми аппаратами (более 10 лет), площадь АТГ имела почти такую же величину (0.087), как у здоровых людей (0.12 ± 0.034). На рис. 2 АТГ представлен зеленой пунктирной линией.

У остальных 8 пациентов, которые составили 3 группу, снижение слуха соответствовало II–III степени и площадь АТГ была невелика (0.048 ± ± 0.0085), по сравнению АТГ здоровых. У 3 из них имели небольшой размер (на рис. 2 обозначены розовой пунктирной линией) и вытянуты вдоль оси ординат. У 5 пациентов треугольники были вытянуты вдоль оси ординат (на рис. 2 АТГ этих пациентов обозначен синей пунктирной линией). Пациенты данной группы использовали слу-

ховые аппараты от 6 до 12 мес. АТГ контрольной группы были сопоставимы со справочными значениями [8].

Средние значения снижения слуха, по данным аудиометрии, были нанесены на график в сопоставлении с площадями АТГ. Метод линейной регрессии выявил сильную линейную зависимость между АТГ и степенью снижения слуха (рис. 3). Коэффициент детерминации был равен 0.719.

Моторный контроль двигательной активности гортани более тесно связан с движением нижней челюсти, чем с движением губ и языка [9]. Тонкие и быстрые изменения в деятельности орофациальных мышц, связанные с выработкой речевых согласных, в значительной степени координируются, но также не зависят от сложной ларингореспираторной деятельности [10]. До сих пор было проведено всего несколько исследований, посвященных оценке параметров акустического пространства гласных у взрослых с нарушениями слуха [11]. Большинство работ сообщают об уменьшении области АПГ [7, 11], что также подтверждается данным исследованием. Площадь АТГ в логарифмических координатах оказалась чувствительной к незначительному снижению остроты слуха у человека без жалоб на слух. Исследование акустических характеристик гласных показало, что говорящие с длительным снижением слуха произносят гласные менее дифференцированно, а площадь их акустического пространства имеет тенденцию к уменьшению [12]. Другие авторы не сообщали о наличии каких-либо заметных внутригрупповых различий у пациентов с ДНС.

Представленная в настоящем исследовании процедура преобразования АТГ показала, что пациенты с ДНС, вероятно, не являются полностью однородной группой. Для уточнения этих результатов необходимы дальнейшие исследования с большим количеством участников исследования.

Таким образом, приведенная в данной статье методика обследования пациентов с ДНС подтверждает теорию о том, что на голосообразование и, как следствие, качество речи у пациентов с длительным нарушением слуха могут оказывать значительное влияние не только степень потери слуха, но и длительность слухопротезирования [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различные сроки использования слуховых аппаратов людьми с ДНС оказывают влияние и на формирование гласных звуков в речеобразующем аппарате. Длительное и качественное слухопротезирование способствует увеличению площади и формированию конфигурации АТГ близким к таковым у хорошо слышащих людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boone D.R., McFarlane S.C., Von Berg S.L.* The voice and voice therapy. Boston: Pearson // Allyn & Bacon. 2005.
2. *Sapir S., Ramig L., Spielman J., Fox C.* Acoustic Metrics of vowel articulation in Parkinson's disease: vowel space area (VSA) vs. vowel articulation index (VAI). // Claudia Manfredi (edited by), Models and analysis of vocal emissions for biomedical applications: 7th international workshop. 2011. P. 173–175.
3. *Kasbi F., Sadollahi A., Bakhtiyari J., Ghorbani R., Maddah M., Mokhlesin M.* The Effect of Hearing Loss on the Vocal Features of Children. // Middle East J Rehabil Health. 2014. V. 1 (1). P. e20844
4. *Lejska M.* Voice Rang and Place of Conversational Voice by Profoundly Hearing Impaired Person. // J. Head and Neck Dis. 2002. V. 6. P. 40.
5. *Scherer S., Morency L., Gratch J., Pestian J.* Reduced vowel space is a robust indicator of psychological distress: A cross-corpus analysis. // IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP). 2015. P. 4789–4793.
6. *Whitfield J.A., Goberman A.M.* Articulatory-acoustic vowel space: Application to clear speech in individuals with Parkinson's disease. // J. Commun. Disord. 2014. V. 51. P. 19–28.
7. *Verhoeven J., Hide O., De Maeyer S., Gillis S., Gillis S.* Hearing impairment and vowel production. A comparison between normally hearing, hearing-aided and cochlear implanted Dutch children. // J. Commun. Disord. 2016. V. 59. P. 24–39.
8. *Derkach M.F., Gumetskii R.Y., Guba B.M., Chaban M.E.* Dinamicheskie spektry rechevykh signalov (The dynamic spectrograms of speech signals). Lvov: Vysshaya Shkola. 1983.
9. *Dromey C., Nissen S.L., Roy N., Merrill R.M.* Articulatory Changes Following Treatment of Muscle Tension Dysphonia: Preliminary Acoustic Evidence. // Journal of Speech, Language, and Hearing Research. 2008. V. 51. P. 196–208.
10. *Davis P.J., Zhang S.P., Winkworth A.L., Bandler R.* Neural control of vocalization: Respiratory and emotional influences. // Journal of Voice. 1996. V. 10. P. 23–38.
11. *Choi E.-A., Seong C.-J.* The Articulation Characteristics of the Profound Hearing-Impaired Adults' Korean Monophthongs: with Reference to the F1, F2 of Acoustic Vowel Space. // Phonetics Speech Sci. 2010. V. 2 (4). P. 229–238.
12. *Ryalls J., Larouche A., Giroux F.* Acoustic comparison of CV syllables in French–speaking children with normal hearing, moderate-to-severe and profound hearing impairment. // Journal of Multilingual Communication Disorders. 2003. V. 1. P. 99–114.
13. *Diab Kh.M., Daikhes N.A., Kaibov A.A., Pashchinina O.A., Arabi A.* Surgical treatment of patients with otosclerosis with grade IV hearing loss and deafness. // Head and neck. Russian Journal. 2020. V. 8 (3). P. 35–43.

INVESTIGATION OF THE ROLE OF HEARING AIDS IN THE FORMATION OF THE AREA OF THE ACOUSTIC FIELD OF VOWELS

A. N. Kovalenko[a], I. V. Kastyro[a,#], Academician of the RAS I. V. Reshetov[b], and V. I. Popadyuk[a]

[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: ikastyro@gmail.com*

The method of transformation of acoustic triangles of vowel sounds (ATW) /a/, /i/, /u/ was used for an objective assessment of the acoustic features of vowels in the speech production of 20 persons with long-term hearing impairment (LHI). The logarithm of the spirit values of the first formants of each vowel (logF1, logF2) was carried out for each subject. ATWs were transformed into right-angled triangles, the vertices of the sound /u/ which were moved to the origin of coordinates, and the legs were aligned with the coordinate axes. In patients with LGI, as a rule, the size of the triangles decreased, and they were stretched along one of the axes, which probably depends not only on the severity of hearing loss, but also on the duration of hearing aids. The presented approach to the normalization of ATW makes it possible to distinguish at least three groups of people with LHI: in the first group, vowel triangles are extended along the logF1 axis, in the second, vowel triangles are extended along the logF2 axis, and in the third, ATW are symmetric.

Keywords: vowel acoustic field, voiceless, logarithmic transformation

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 209–212

УДК 575.22:595.773.4

CTCF ЧЕЛОВЕКА ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С CP190 ДРОЗОФИЛЫ, НО НЕ С KAISO

© 2021 г. К. Ю. Халисова[1], академик РАН П. Г. Георгиев[1], А. Н. Бончук[1,*]

Поступило 04.12.2020 г.
После доработки 13.01.2021 г.
Принято к публикации 14.01.2021 г.

CTCF человека (hCTCF) является основным архитектурным белком млекопитающих. У дрозофилы гомолог CTCF (dCTCF) взаимодействует с BTB доменом белка CP190, участвующего в создании открытого хроматина и инсуляции. Ранее было показано, что BTB-содержащий белок Kaiso взаимодействует с hCTCF и регулирует его активность. Нами было проведено подробное исследование взаимодействия между белками в дрожжевой двугибридной системе. Неожиданным оказалось, что Kaiso не взаимодействует с hCTCF и его гомологом у дрозофилы. С другой стороны, CP190 взаимодействовал с C-концом hCTCF. Полученные результаты демонстрируют, что взаимодействие между белками CTCF и CP190 является высококонсервативным. Вероятно, что у человека есть другие BTB-содержащие белки, которые выполняют функции, описанные для белка CP190 дрозофилы.

Ключевые слова: архитектурные белки, хроматиновый инсулятор, регуляция транскрипции, BTB домен

DOI: 10.31857/S2686738921020128

Высококонсервативный среди высших эукариот белок CTCF имеет неструктурированные концевые домены и расположенный в центральной части кластер, состоящий из 11 цинковых пальцев C2H2 типа [1]. У млекопитающих CTCF является основным охарактеризованным архитектурным белком, который поддерживает дистанционные контакты между удаленными участками хромосом [2]. У дрозофилы гомолог CTCF (dCTCF) участвует в организации инсуляторов и дистанционных взаимодействий совместно с белком CP190 [3, 4]. Согласно современным представлениям, подкрепленным многочисленными экспериментальными результатами, у млекопитающих CTCF в кооперации с когезиновым комплексом формирует границы хроматиновых петель и определяет границы большей части топологически ассоциированных доменов (ТАДов) [5]. Также у белков CTCF были идентифицированы N-концевые гомодимеризующие домены, которые могут быть вовлечены в организацию специфичных дистанционных взаимодействий [6]. Роль других партнеров белка hCTCF в организации архитектуры хромосом остается слабо исследованной.

Ранее было показано, что BTB домен белка Kaiso взаимодействует с C-концевым неструктурированным районом белка hCTCF [7]. Белок Kaiso человека имеет на N-конце BTB/POZ домен и 3 цинковых пальца, которые узнают метилированный сайт на ДНК [8]. BTB/POZ является высококонсервативным доменом у высших эукариот, который формирует гомодимеры и участвуют в белок-белковых взаимодействиях для привлечения транскрипционных комплексов на хроматин [9]. Для Kaiso было показано участие в метилзависимой репрессии путем привлечения корепрессоров N-CoR и SMRT [10].

К семейству белков, содержащих N-концевой BTB/POZ домен, также относится белок CP190, который преимущественно связывается с промоторами генов домашнего хозяйства и инсуляторами и участвует в поддержании их активности [11]. Нами было показано, что белок CP190 может взаимодействовать с ДНК-связывающими архитектурными белками с помощью BTB и M домена [1, 4]. В том числе BTB домен белка CP190 взаимодействует с C-концевым участком белка dCTCF [4]. Белки Kaiso и CP190 имеют во многом сходное строение, что предполагает вероятный консерватизм их функций. Целью исследования стала проверка, насколько консервативны могут быть взаимодействия между CTCF и BTB-содержащими белками у человека и дрозофилы.

[1] *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия*
**e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru*

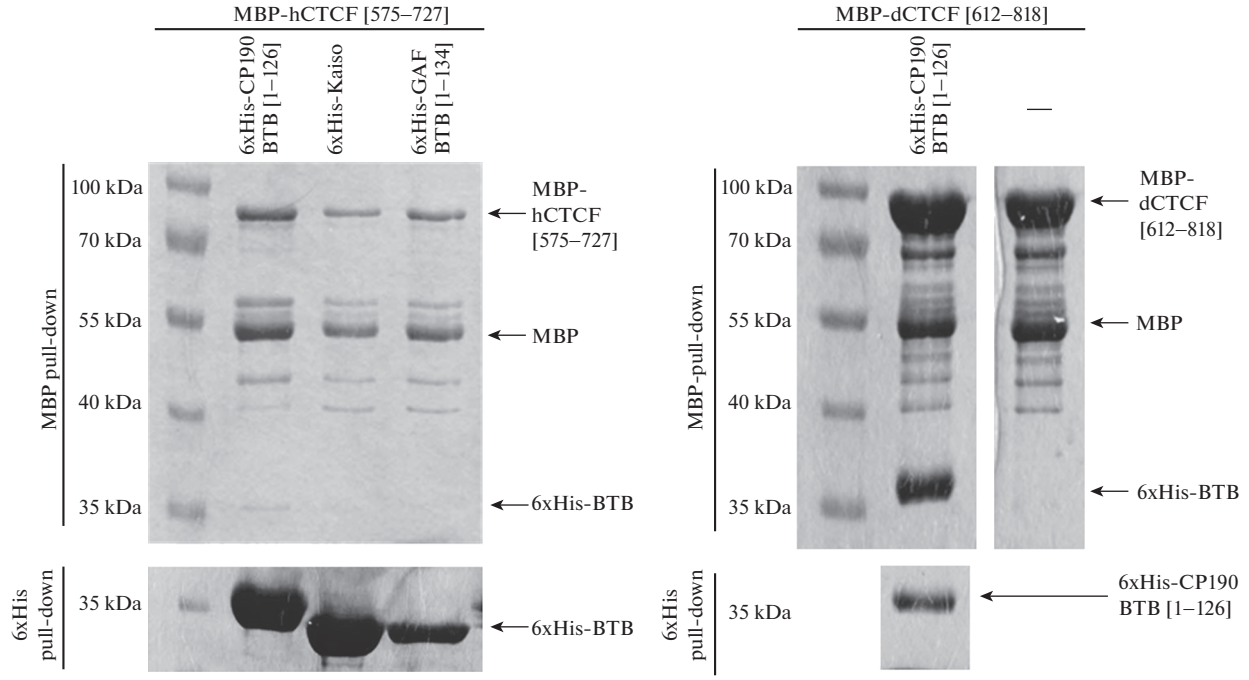

Рис. 1. Анализ взаимодействия между слитыми с MBP C-концевыми доменами белков CTCF человека и дрозофилы (hCTCF и dCTCF) и BTB доменами Kaiso, CP190, GAF, слитыми с 6xHis, *in vitro* при помощи соосаждения на иммобилизованной амилозе (MBP-pulldown). Соосаждение на Ni-NTA (6xHis-pulldown) использовалось как контроль уровня экспрессии BTB-доменов. Соосажденные белки были разделены при помощи SDS-PAGE и окрашены Coomassie. Позиции аминокислотных остатков указаны в квадратных скобках.

Так как взаимодействие между C-концевой областью hCTCF и BTB доменом Kaiso было исследовано только в дрожжевой двугибридной системе, было решено протестировать взаимодействие между Kaiso и hCTCF *in vitro*. С этой целью были проэкспрессированы в бактериях C-концевой домен белка CTCF человека (575-727), соединенный с мальтозо-связывающим белком (MBP) и BTB домены белков CP190 (1-126), Kaiso (1-130) и GAF (1-134), сшитые с полигистидиновой меткой (6xHis) для дальнейшего соосаждения белков *in vitro* на аффинном носителе (иммобилизованной амилозе или Ni-NTA сефарозе). Очистка белков за 6xHis использовалась в качестве положительного контроля экспрессии BTB доменов в бактериях. В результате было показано, что BTB Kaiso и CP190 не взаимодействуют с C-концом CTCF человека (рис. 1). В то же время BTB домен CP190 соосаждается с C-концевым участком dCTCF. Таким образом, не было подтверждено взаимодействие между Kaiso и hCTCF *in vitro*.

Для подтверждения непредвиденного результата было проведено исследование взаимодействия между белками в дрожжевой двугибридной системе, которая позволяет изучать целые белки, а не их отдельные домены (рис. 2). Белок Kaiso имеет один-два района, которые могут приводить к сильной активации транскрипции репортерных генов, в том случае если они соединены с ДНК-связывающим доменом GAL4, что ограничивало применение данных конструкций полноразмерного белка для оценки взаимодействий в дрожжевой двугибридной системе. Исследования полноразмерного Kaiso возможны лишь в случае соединения его с активационным доменом GAL4. Для полной картины нами также были исследованы меньшие фрагменты белка, содержащие BTB домен, BTB домен и прилежащие неструктурированные участки, кластер цинковых пальцев (рис. 2в). Для оценки консервативности взаимодействия BTB-содержащих белков с CTCF были тестированы взаимодействия белка CP190 с CTCF человека (рис. 2а, 2б). Положительными контролями эксперимента служила способность BTB-содержащих белков (Kaiso, CP190) к димеризации.

В результате всех проведенных исследований нами не было показано взаимодействие между BTB Kaiso и hCTCF. Интересно, что большие фрагменты белка Kaiso, включающие прилежащие неструктурированные участки белка, также не взаимодействуют с hCTCF, что противоречит ранее полученным в дрожжевой системе данным [7]. Также с Kaiso не взаимодействует dCTCF. При исследовании взаимодействия белка CP190 было обнаружено, BTB домен белка CP190 взаимодействовал только с C-концевым районом CTCF дрозофилы. Неожиданным оказалось, что

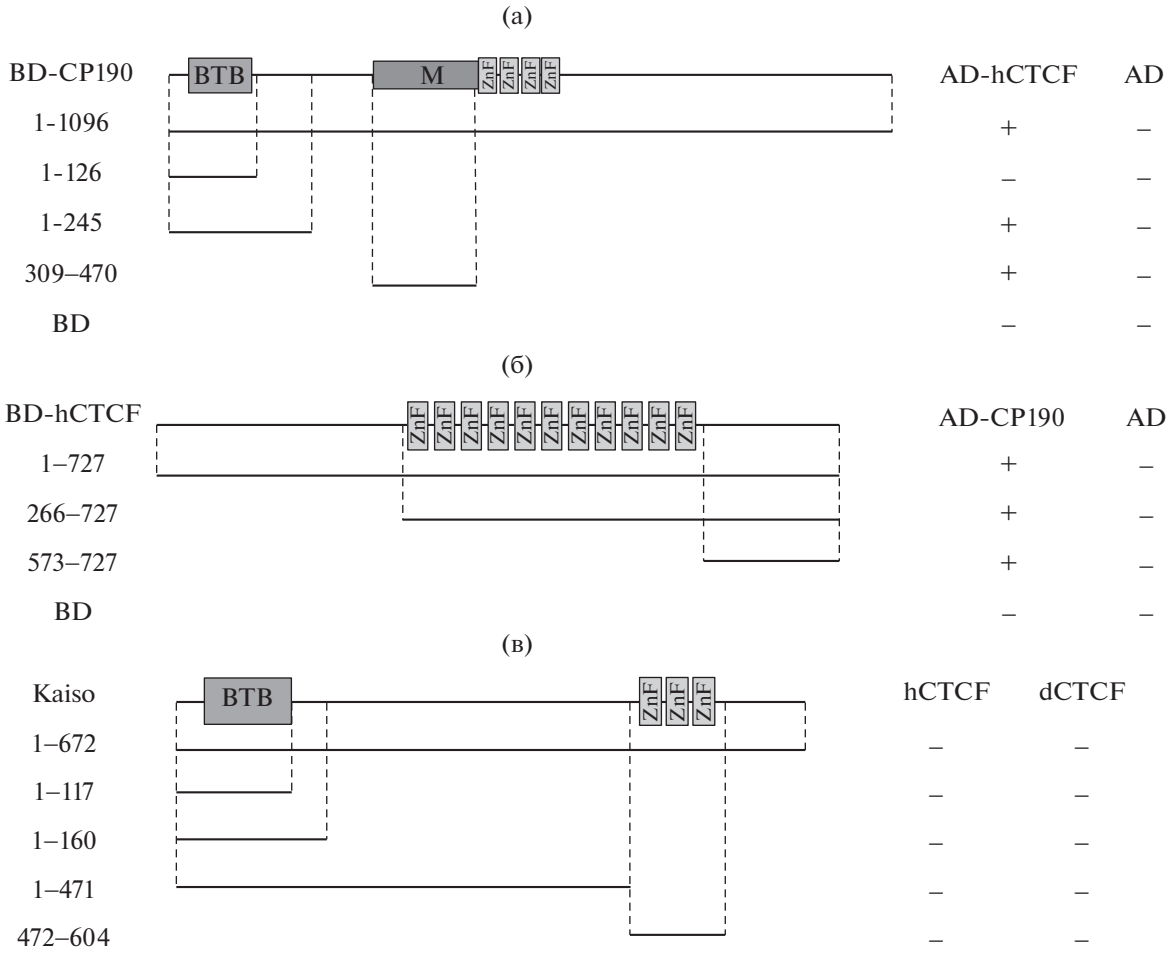

Рис. 2. Исследование взаимодействий между белками dCTCF, hCTCF, Kaiso и CP190 в дрожжевой двугибридной системе. (а) Исследование взаимодействия между CP190 и hCTCF. Фрагменты CP190 были слиты с ДНК-связывающим доменом GAL4 (BD) и исследовано их взаимодействие с hCTCF, слитым с активационным доменом GAL4 (AD). На схеме полноразмерного CP190 белковые домены обозначены прямоугольниками, линии показывают исследуемые фрагменты белка (соответствующие аминокислотные остатки указаны слева). Результаты представлены в колонках справа, где + и – означают наличие или отсутствие взаимодействия соответственно. В качестве положительного контроля проверялась способность BTB доменов к димеризации, а в качестве отрицательного контроля – тестирование на наличие взаимодействия только с активационным (AD) или ДНК-связывающим (BD) доменом белка GAL4. (б) Локализация домена белка hCTCF, необходимого для взаимодействия с CP190. Различные фрагменты hCTCF были слиты с ДНК-связывающим доменом GAL4 и исследовано их взаимодействие с CP190, слитым с активационным доменом GAL4. Остальные обозначения такие же, как в (а). (в) Исследование взаимодействия между белками Kaiso и hCTCF, dCTCF. Полноразмерный Kaiso был слит с активационным доменом GAL4, различные фрагменты Kaiso были соединены как с ДНК-связывающим, так и с активационным доменом GAL4. Все полученные производные были протестированы в дрожжевой двугибридной системе на способность к взаимодействию с CTCF человека и дрозофилы. Остальные обозначения такие же, как в (а).

М-домен белка CP190 одновременно взаимодействует с С-концами белков CTCF дрозофилы и человека, что указывает на консервативность взаимодействия.

Отсутствие взаимодействия между белками Kaiso и hCTCF нельзя считать неожиданным. Эти белки являются антагонистами в регуляции экспрессии и связывании с геномными сайтами. Белок CTCF обеспечивает создание открытого хроматина и теряет способность связываться с метилированными сайтами, что приводит к инактивации транскрипции [2]. Наоборот, Kaiso связывается с метилированной ДНК и может рекрутировать комплексы, которые усиливают метилирование ДНК и репрессию транскрипции [12, 13]. Вследствие этого можно предположить, что hCTCF и Kaiso формируют на хроматине альтернативные комплексы. Обратная ситуация наблюдается в случае dCTCF и CP190, которые функционируют совместно в организации активных промоторов и инсуляторов [4, 11, 14]. Можно предположить, что взаимодействие между CTCF

и CP190-подобными белками является высококонсервативным и M-подобный домен осуществляет взаимодействие между неидентифицированным BTB-содержащим белком и hCTCF при активации промоторов человека. В настоящее время не найдено стабильных BTB-содержащих партнеров белка hCTCF, поэтому направленный поиск партнеров hCTCF между BTB белками человека является актуальной задачей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., et al.* // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 2. P. 47–58.
2. *Arzate-Mejía R.G., Recillas-Targa F., Corces V.G.* // Development. 2018. V. 145. P. 6.
3. *Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., et al.* // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. P. 8. P. 3042–3052.
4. *Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., et al.* // BMC Biol. 2015. V. 13. P. 63.
5. *Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G., et al.* // Sci Adv. 2019. V. 5. P. 4.
6. *Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., et al.* // Sci Rep. 2020. V. 10. P. 1.
7. *Defossez P.A., Kelly K.F., Filion G.J., et al.* // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 52. P. 43017–43023.
8. *Prokhortchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., et al.* // Genes Dev. 2001 V. 15. P. 13.
9. *Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J., et al.* // Genome Biol. 2005. V. 6. № 10. P. 1–18.
10. *Raghav S.K., Waszak S.M., Krier I., et al.* // Mol Cell. 2012. V. 46. P. 335–350.
11. *Ahanger S.H., Shouche Y.S., Mishra R.K., et al.* // Nucleus. 2013. V. 4. № 2. P. 115–22.
12. *Filion G.J., Zhenilo S., Salozhin S., et al.* // Mol Cell Biol. 2006. V. 1. P. 169–181.
13. *Zhenilo S., Deyev I., Litvinova E., et al.* // Cell Death Differ. 2018. V. 11. P. 1938–1951.
14. *Bartkuhn M., Straub T., Herold M., et al.* // EMBO J. 2009. V. 28(7). P. 877–888.

HUMAN CTCF INTERACTS WITH DROSOPHILA CP190, BUT NOT WITH KAISO

K. Y. Khalisova[a], Academician of the RAS P. G. Georgiev[a], and A. N. Bonchuk[a,#]

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

[#]*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru*

Human CTCF (hCTCF) is a major architectural protein in mammals. In Drosophila, the CTCF homologue (dCTCF) interacts with the BTB domain of the CP190 protein, which is involved in the establishment of open chromatin and activity of insulators. Previously, it was shown that the BTB protein Kaiso interacts with hCTCF and regulates its activity. We have carried out a detailed study of the interaction between these proteins in a yeast two-hybrid assay. Surprisingly, Kaiso did not interact with hCTCF and its Drosophila homologue. On the other hand, CP190 interacted with the C-terminus of hCTCF. The results obtained demonstrate that the interaction between CTCF and CP190 proteins is highly conserved. It is likely that humans have other BTB proteins that perform the functions described for the Drosophila CP190.

Keywords: architectural proteins, chromatin insulator, regulation of transcription, BTB domain

ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2021, том 497, с. 213–216

УДК 599.723(571.54/.55)

НАХОДКА РАННЕПЛИОЦЕНОВЫХ ОКАМЕНЕЛОСТЕЙ ТРЕХПАЛОЙ ЛОШАДИ (*HIPPARION TCHICOICUM* IVANJEV, 1966) В ЗАПАДНОМ ЗАБАЙКАЛЬЕ

© 2021 г. Н. П. Калмыков*

Представлено академиком РАН Г.Г. Матишовым
Поступило 12.10.2020 г.
После доработки 16.10.2020 г.
Принято к публикации 16.10.2020 г.

В сообщении речь идет о находке плиоценовых окаменелостей трехпалой лошади (*Hipparion tchicoicum*) в Западном Забайкалье. Возраст фауны млекопитающих из красно-бурой глины в местонахождении Удунга указывает на то, что чикойский гиппарион обитал на юге Восточной Сибири и во второй половине раннего плиоцена, где его остатки были известны только из красноцветных отложений верхнего плиоцена. Эта находка дала возможность заполнить имеющийся хиатус (ранний плиоцен) в его стратиграфическом распространении: поздний миоцен – поздний плиоцен. Ареал этого вида трехпалой лошади, не выходивший за пределы Северного Китая, Северной Монголии, юга Восточной Сибири, говорит о том, что его эволюция протекала в пределах Внутренней Азии.

Ключевые слова: миоцен, плиоцен, млекопитающие, *Hipparion tchicoicum*, Удунга, Западное Забайкалье
DOI: 10.31857/S268673892101011X

Эволюция трехпалых лошадей (*Hipparion*) тесно связана с историей Палеарктической зоогеографической области, однако на огромном пространстве России она слабо изучена ввиду редких находок их остатков. В отличие от сопредельных территорий (Европа, Кавказ, Средняя Азия, Монголия, Китай), где их фоссилии часты и многочисленны, гиппарионы от Предкавказья и юга Русской равнины на западе и до Дальнего Востока за редким исключением указываются только в списках неогеновой фауны Крыма (*Hipparion sebastopolitanum* Borissiak, 1911) [1, 2], Северного Приазовья (*Hipparion* sp.) [3], Предкавказья (*Hipparion* sp., *Hipparion stavropolensis* Macarovici, 1967, *Cormohipparion* sp.) [4, 5], Алтая (*Hipparion* sp.) [6], Восточной Сибири (*Hipparion tchicoicum* Ivanjev, 1966, *Hipparion houfenese* Teilhard de Chardin et Young, 1931, *Hipparion* sp., *Proboscidipparion senense* Teilhard de Chardin et Piveteau, 1930) [7–9] (рис. 1). В Западном Забайкалье их остатки, представленные в основном молочными зубами и отдельными неполными костями конечностей, были описаны в 60-х годах прошлого столетия только из одного местонахождения – Береговая (долина р. Чикой). Костный материал, собранный исследователями из разных горизонтов этого захоронения [7, 8], не привел к единому мнению о приуроченности его к тем или иным слоям, их самостоятельности и таксономической принадлежности окаменелостей [9].

В этой связи находка окаменелостей трехпалой лошади на юге Восточной Сибири в местонахождении Удунга (Западное Забайкалье) вызывает особый интерес, поскольку она позволяет расширить имеющиеся представления не только о стратиграфическом распространении, но и морфологии, экологии этих вымерших животных, доживших до раннего плейстоцена в Азии, до среднего плейстоцена – в Африке. В отличие от Северного Китая, где из красноцветных отложений определены многие виды гиппарионов, а их остатки зачастую не имеют достоверной географической и стратиграфической привязки, фоссилии из отложений у подножия горы Балжи-Хангил (1132.0 м) на юго-западном окончании Хамбинского хребта (левобережье р. Темник, 0.5 км восточнее с. Удунга) строго привязаны [10]. Остеологический материал из этого захоронения не только своеобразен по своему таксономическому составу, но и предоставляет редкий случай для того, чтобы прояснить распространение краевых популяций во времени, как трехпалых лошадей, так и других млекопитающих, иначе

Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия
**e-mail: kalm@ssc-ras.ru*

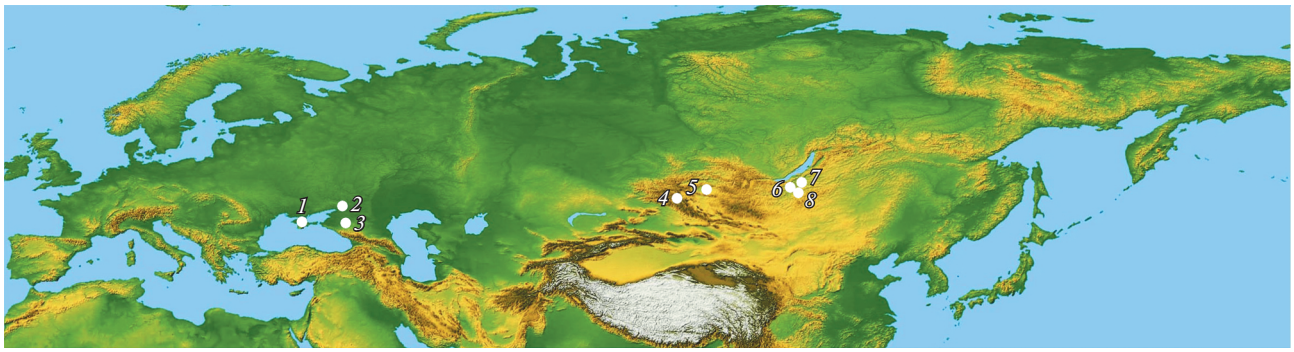

Рис. 1. Места находок окаменелостей трехпалых лошадей (*Hipparion*) на территории России: *1* – Крым (поздний миоцен), *2* – Приазовье (поздний миоцен?), *3* – Предкавказье (поздний миоцен – ранний плиоцен), *4* – Алтай (поздний плиоцен), *5* – Тува (поздний плиоцен), *6–8* – Западное Забайкалье (Удунга, Тологой, Береговая, плиоцен).

взглянуть на пути их расселения в миоцене и плиоцене.

На юге Восточной Сибири, кроме Западного Забайкалья, *Hipparion* sp. был описан по небольшому материалу из красноцветных отложений позднего плиоцена Тувы (Холу) [9]. В Северной Монголии (Шамар), Северном Китае (Тученцзи, Вуланхуа, Эртэмтэ, Юше, Нихэвань) [9, 11], Казахстане (Бетеке, Калба), Западной Сибири (Алтай) [6] в схожих отложениях также были найдены окаменелости гиппарионов, возраст которых был определен в довольно широком диапазоне: поздний миоцен – поздний плиоцен. Все они, как уже упоминалось, связаны с “красными глинами” или “красноватыми песками”, подошва которых указывает на существование расчлененного рельефа в Центральной Азии и присущих только ей климатических условий. Ниже них, или так называемых слоев “red clays”, получивших в Северном Китае название формации Паотэ, они не встречаются. В этой связи стоит отметить, что во Внутренней Азии гиппарионовая фауна в целом обитала в эпоху аккумуляции красноцветных отложений монтмориллонит-карбонатной формации, представленной в Западном Забайкалье, как “красными глинами” (местонахождения Тологой и Улан-Удэ), так и “красноватыми песками” (местонахождение Береговая) чикойской свиты. Ее осадки содержат, помимо трехпалых лошадей (*H. houfenense, H. tchicoicum, Proboscidipparion senense*), остатки и других млекопитающих позднего плиоцена [7, 8].

Местонахождение Удунга на левом берегу р. Темник связано с осадками второй толщи предгорного шлейфа, сложенной красно-бурой глиной, и включающей многочисленные окаменелости различных животных [10], в том числе трехпалой лошади. Последняя представлена как зубами верхней и нижней челюсти, так и костями посткраниального скелета различной степени сохранности (рис. 2): запястья, заплюсны, передними и задними метаподиями (II, III, IV), фалангами (I, II, III).

На верхних коренных зубах гиппариона из Удунги, как и у *H. tchicoicum* из Береговой и Шамара, протокон короткий и широкий или, как у *H.* (*Baryhipparion*) *tchicoicum* из Баогедэ Ула (Внутренняя Монголия, Китай) [11], короткий и округлый. Подобно чикойскому гиппариону из Береговой и Шамара, для нижних зубов из долины р. Темник характерна двойная петля гиппарионового типа с чертами стеноновой лошади. Эти признаки, наряду с крупными размерами животного, позволили отнести остатки трехпалой лошади из красно-бурой глины Западного Забайкалья (Удунга) к *Hipparion tchicoicum* Ivanjev, 1966, впервые описанного по P3 (P4?) из долины р. Чикой (ферма Береговая, Селенгинское среднегорье).

Не только таксономический состав териофауны и сравнение с фаунами сопредельных территорий, но и узкое стратиграфическое распространение отдельных ее таксонов свидетельствует о том, что чикойский гиппарион обитал на юге Восточной Сибири и во второй половине раннего плиоцена. Раннеплиоценовый возраст фауны млекопитающих из красно-бурой глины у подножия горы Балжи-Хангил дал основание понизить нижний предел стратиграфического распространения *H. tchicoicum* на юге Восточной Сибири до начала второй половины раннего плиоцена. Присутствие в фауне этого местонахождения индомалайских форм – красной, или малой панды (*Parailurus* sp.), тонкотелой обезьяны (*Parapresbytis eohanuman* Borissoglebskaya, 1981), аксиса (*Axis shansius* Teilhard de Chardin et Trassaert, 1937), в свою очередь, подтвердило предположения, что граница Восточной (Индо-Малайской) зоогеографической области в это время проходила намного севернее, чем в настоящее время.

О том, что *H. tchicoicum* во Внутренней Азии обитал и раньше, свидетельствуют его окаменелости из позднего миоцена Северного Китая [12],

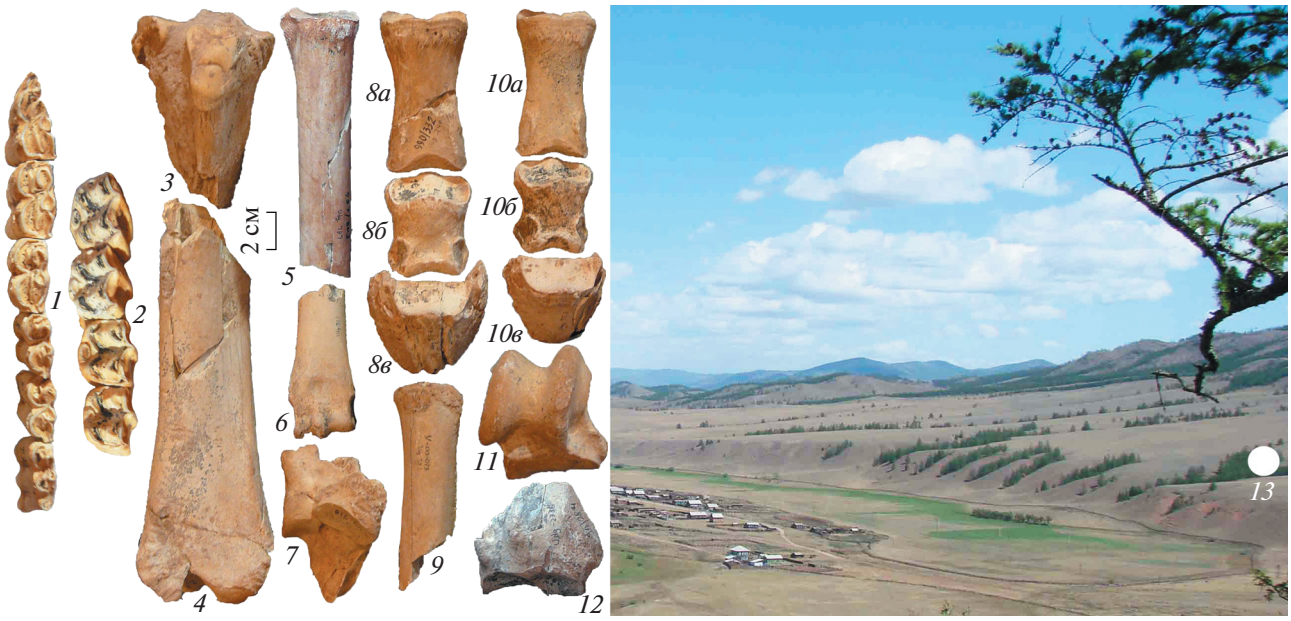

Рис. 2. Зубы и кости *H. tchicoicum* из местонахождения Удунга (Западное Забайкалье, ранний плиоцен): *1* – p2-m3, *2* – P3-M2, *3, 4* – большая берцовая кость (*3* – проксимальный конец, *4* – дистальный конец), *5, 6* – mt III (*5* – проксимальный конец, *6* – дистальный конец), *7* – пяточная кость, *8* – фаланги передней конечности (*а* – ph I, *б* – ph II, в – ph III), *9* – проксимальный конец mc III, *10* – фаланги задней конечности (*а* – ph I, *б* – ph II, *в* – ph III), *11* – астрагал, *12* – дистальный конец лучевой кости, *13* – местонахождение.

где его остатки найдены в отложениях, накапливавшихся до начала излияния базальтов в местности Баогедэ Ула в центральной части Внутренней Монголии примерно 6–7 млн назад. Позже на основании датировки базальтов K–Ar методом время их накопления было уточнено (от 6.8 ± 0.2 до 6.3 ± 0.2 млн лет) [13]. Залегание окаменелостей микромаммалий ниже горизонта с фоссилиями чикойского гиппариона и абсолютные даты позволили предположить [11], что в палеонтологической летописи Внутренней Монголии он появился около 6 млн лет назад. В дальнейшем *H. tchicoicum* значительно раздвинул свой ареал, в раннем плиоцене достигает южного обрамления оз. Байкал. Таким образом, находка окаменелостей в нижнеплиоценовых отложениях Западного Забайкалья (местонахождение Удунга) заполняет хиатус в стратиграфическом распространении *H. tchicoicum*, эволюция которого протекала в пределах Внутренней Азии с позднего миоцена до конца плиоцена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дуброво И.А., Капелист К.В.* Каталог местонахождений третичных позвоночных УССР. М.: Наука, 1979. 160 с.

2. *Короткевич Е.Л.* История формирования гиппарионовой фауны Восточной Европы. Киев: Наукова думка, 1988. 164 с.

3. *Алексеева Л.И.* Термофауна раннего антропогена Восточной Европы. М.: Наука, 1977. 215 с.

4. *Меладзе Г.К.* Обзор гиппарионовых фаун Кавказа. Тбилиси: Мецниереба, 1985. 94 с.

5. *Тарасенко К.К., Лопатин А.В., Зеленков Н.В. и др.* Новые местонахождения наземных и морских позвоночных позднего миоцена в Адыгее (Россия, Северный Кавказ) // Доклады Академии наук. 2014. Т. 459. № 6. С. 726–726. https://doi.org/10.7868/S0869565214360225

6. *Великовская Е.М.* Плиоценовые отложения юго-западного Алтая и Зайсанской котловины. М.: Изд-во МГУ, 1964. 80 с.

7. *Иваньев Л.Н.* К вопросу стратиграфического расчленения кайнозойских красноцветов Западного Забайкалья по данным палеонтологии // Изв. Вост.-Сиб. отдела Географического об-ва СССР. 1966. Т. 65. С. 82–94.

8. Млекопитающие эоплейстоцена Западного Забайкалья / Э.А. Вангенгейм, Е.И. Беляева, В.Е. Гарутт, Е.Л. Дмитриева, В.С. Зажигин. М.: Наука. 1966. 164 с.

9. *Жегалло В.И.* Гиппарионы Центральной Азии. М.: Наука, 1978. 156 с.

10. *Калмыков Н.П.* Местонахождение Удунга (Западное Забайкалье, Россия): геология и фауна млекопитающих раннего плиоцена // Отечественная геология. 2017. № 2. С. 76–82.

11. *Deng, T., Wang H., Wang X., et al.* The Late Miocene Hipparion (Equidae, Perissodactyla) fossils from Baogeda Ula, Inner Mongolia, China // Historical Bi-

ology. 2016. V. 28, № 1–2. P. 52–67. https://doi.org/10.1080/08912963.2015.1020425

12. *Wang X.-M., Tseng Z.J., Takeuchi G.T.* Zoogeography, molecular divergence, and the fossil record: the case of an extinct fisher, Pekania palaeosinensis (Mustelidae, Mammalia), from the Late Miocene Baogeda Ula Formation, Nei Mongol // Vert PalAsiat. 2012. V. 50. P. 293–307.
13. *Li Q.* Magnetostratigraphic dating of Neogene mammalian faunas in central Inner Mongolia, northern China [PhD dissertation]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences. 2014.

FIND OF EARLY PLIOCENE FOSSILS OF HORSES (*HIPPARION TCHICOICUM* IVANJEV, 1966) IN THE WESTERN TRANSBAIKALIE

N. P. Kalmykov[#]

Federal Research Center Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

[#]*e-mail: kalm@ssc-ras.ru*

Presented by Academician of the RAS G.G. Matishov

The report is about a discovery of fossils of Pliocene tridactyl horse (*Hipparion tchicoicum*) in Western Transbaikalia. The age of the mammalian fauna from the red-brown clay at the Udunga locality indicates that the Chikoian hipparion lived in the south of Eastern Siberia and in the second half of the Early Pliocene, where its remains were known only from the red-colored deposits of the Upper Pliocene. This find made it possible to fill the existing hiatus (Early Pliocene) in its stratigraphic distribution: Late Miocene – Late Pliocene. The range of this species of the tridactyl horse, which did not go beyond the borders of Northern China, Northern Mongolia, and the south of Eastern Siberia, suggests that its evolution took place within Inner Asia.

Keywords: Miocene, Pliocene, mammals, *Hipparion tchicoicum*, Udunga, Western Transbaikalia