

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 506, 2022

- Участие оксида азота в реализации гемостатических эффектов пептидов глипролинового ряда  
*М. Е. Григорьева, Н. Ф. Мясоедов, Л. А. Ляпина* 333
- Комплекс Tag7-Mts1 вызывает хемотаксис регуляторных Т-лимфоцитов  
*О. К. Иванова, Т. Н. Шарпова, Е. А. Романова, Л. П. Сащенко, Д. В. Яшин, Г. П. Георгиев* 338
- Влияние ксилазин-золетиловой анестезии на радиочувствительность мышей при тотальном облучении рентгеновским излучением, протонами и ионами углерода  
*В. Е. Балакин, О. М. Розанова, Е. Н. Смирнова, Т. А. Белякова, Н. С. Стрельникова* 343
- Влияние наночастиц кремния на активность антиоксидантных ферментов в корнях томатов при инвазии галловой нематодой *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949  
*Ж. В. Удалова, С. В. Зиновьева* 349
- Транскрипционные факторы семейства GLKs участвуют в цитокинин-зависимой регуляции экспрессии гена пластидной РНК-полимеразы *SCA3* в ходе деэтиоляции *Arabidopsis thaliana*  
*А. С. Дорошенко, А. М. Малюкова, М. Н. Данилова, Вл. В. Кузнецов, В. В. Кузнецов* 354
- Гелданамицин усиливает радиозащитное действие пероксиредоксина 6 в облученных ЗТЗ фибробластах  
*Е. Г. Новосёлова, О. В. Глушкова, М. Г. Шарпов, М. О. Хренов, С. Б. Парфенюк, С. М. Лунин, Т. В. Новосёлова, Э. К. Мубаракшина, Р. Н. Гончаров, Е. Е. Фесенко* 361
- Индукция гипоксического ответа в клетках САСО-2 приводит к увеличению экспрессии генов, вовлеченных в эндоцитоз и трансцитоз SARS-COV-2  
*С. А. Нерсисян* 366
- Привлечение на хроматин (GA)n-ассоциированных факторов GAF И Psq в трансгенной модельной системе зависит от присутствия сайтов связывания архитектурных белков  
*Д. А. Четверина, Ф. В. Горбенко, Д. В. Ломаев, П. Г. Георгиев, М. М. Ерохин* 371
- Повышение эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов  
*В. В. Шумянцева, П. И. Королева, А. А. Гилеп, К. С. Напольский, Ю. Д. Иванов, С. Л. Канашенко, А. И. Арчаков* 377
- Доставка антителоподобных молекул, монободи, способных связываться с нуклеокапсидным белком вируса SARS-COV-2, в клетки-мишени  
*Ю. В. Храмов, А. В. Уласов, Т. Н. Лупанова, Г. П. Георгиев, А. С. Соболев* 383
- Разработка инструментального метода определения типов поведения белухи (*Delphinapterus leucas*) по параметрам ускорения  
*О. И. Лямин, Е. А. Назаренко, В. В. Рожнов* 387

Синтез и противогриппозная активность (со)полимеров винилфосфоновой кислоты <i>В. В. Зарубаев, Е. В. Бучков, О. В. Назарова, Ю. И. Золотова, Е. Ф. Панарин</i>	392
Раннеплейстоценовый подковонос <i>Rhinolophus macrorhinus cimmerius</i> subsp. Nov. (Rhinolophidae, Chiroptera) из пещеры Таврида в Крыму <i>А. В. Лопатин</i>	396
Апоптотические процессы предшествуют заражению симбиотическими бактериями личинок погонофор (Siboglinidae, Annelida) <i>Н. Н. Римская-Корсакова, Е. Н. Темерева, В. В. Малахов</i>	406
Перестройка оптокинетического рефлекса в период метаморфоза у обыкновенной чесночницы ( <i>Pelobates fuscus</i> , Laug.) <i>Е. И. Киселева, О. Ю. Орлов, В. А. Бастаков</i>	411
Роль рекомбинантного гликоделина в дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов <i>К. Ю. Шардина, В. П. Тимганова, М. С. Бочкова, П. В. Храмцов, М. Б. Раев, С. А. Заморина</i>	417
Сравнительная оценка содержания плутония и радиоцезия в мышцах рыб р. Енисей <i>Т. А. Зотина, М. С. Мельгунов, Д. В. Дементьев, Ю. В. Александрова</i>	422
Метилбогатая диета матери повышает дофаминергический тонус мезолимбической системы мозга у взрослого потомства крыс линии WAG/RIJ <i>К. Ю. Саркисова, Е. А. Федосова, А. Б. Шацкова, В. Б. Наркевич, В. С. Кудрин</i>	427
Первый опыт содержания погонофор (Annelida: Siboglinidae) в лабораторных условиях <i>А. А. Прудковский, Н. П. Карасева, М. Н. Римская-Корсакова, Т. П. Пименов, Н. Н. Римская-Корсакова, В. В. Малахов</i>	433

---

---

# CONTENTS

Vol. 506, 2022

Participation of nitric Oxide in the Realization of Hemostatic Glyproline Peptides effects <i>M. E. Grigorieva, N. F. Myasoedov, L. A. Lyapina</i>	333
TAG7-MTS1 Complex Activates Chemotaxis of Regulatory T-lymphocytes <i>O. K. Ivanova, T. N. Sharapova, E. A. Romanova, L. P. Sashchenko, D. V. Yashin, G. P. Georgiev</i>	338
The Effect of Xylazine/zoletil Anesthesia on the Radiosensitivity of Mice under Total IRRADIATION with X-rays, Protons and Carbon Ions <i>V. E. Balakin, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, T. A. Belyakova, N. I. Strelnikova</i>	343
Effects of Silicon Nanoparticles on the Activity of Antioxidant Enzymes in Tomato Roots Invaded by <i>Meloidogyne Incognita</i> (Kofoid et white, 1919) Chitwood, 1949 <i>Zh. V. Udalova, S. V. Zinovieva</i>	349
Transcription Factors of the GLRs Family are Involved in Cytokinin-dependent Regulation of Plastid RNA Polymerase <i>SCA3</i> gene Expression during Deetiolation of <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>A. S. Doroshenko, A. M. Malyukova, M. N. Danilova, Vl. V. Kuznetsov, V. V. Kusnetsov</i>	354
Geldanamycin Enhances the Radioprotective Effect of Peroxyredoxin 6 in irradiated 3T3 Fibroblasts <i>E. G. Novoselova, O. V. Glushkova, M. G. Sharapov, M. O. Khrenov, S. B. Parfenyuk, S. M. Lunin, T. V. Novoselova, A. K. Mubarakshina, R. G. Goncharov, E. E. Fesenko</i>	361
Induction of Hypoxic Response in Caco-2 cells Promote the Expression of Genes Involved in SARS-CoV-2 Endocytosis and Transcytosis <i>S. A. Nersisyan</i>	366
Recruitment to Chromatin of (GA)n-associated Factors GAF and Psq in the Transgenic Model System Depends on the Presence of Architectural Protein Binding Sites <i>D. A. Chetverina, F. V. Gorbenko, D. V. Lomaev, P. G. Georgiev, M. M. Erokhin</i>	371
Increasing the Efficiency of Cytochrome P450 3A4 Electrocatalysis Using Electrode Modification with Spatially Ordered Anodic Aluminum Oxide-based Nanostructures for Investigation of Metabolic Transformations of Drugs <i>V. V. Shumyantseva, P. I. Koroleva, A. A. Gilep, K. S. Napolskii, Yu. D. Ivanov, S. L. Kanashenko, A. I. Archakov</i>	377
Delivery of Antibody-like Molecules, Monobodies, Capable of Binding with SARS-COV-2 Virus Nucleocapsid Protein, into Target Cells <i>Y. V. Khramtsov, A. V. Ulasov, T. N. Lupanova, G. P. Georgiev, A. S. Sobolev</i>	383
Evaluation of an Instrumental Method of Characterization of Beluga ( <i>Delphinapterus leucas</i> ) Behaviors Based on the Parameters of Acceleration <i>O. I. Lyamin, E. A. Nazarenko, V. V. Rozhnov</i>	387

Synthesis and Anti-influenza Activity of Vinylphosphonic Acid (co)polymers <i>V. V. Zarubaev, E. V. Buchkov, O. V. Nazarova, Yu. I. Zolotova, E.F. Panarin</i>	392
Early Pleistocene Horseshoe BAT <i>Rhinolophus macrorhinus cimmerius</i> subsp. nov. (Rhinolophidae, Chiroptera) from the Taurida cave in Crimea <i>A. V. Lopatin</i>	396
Apoptotic Processes Precede Symbionts' Infection of <i>Pogonophoran</i> (Siboglinidae, Annelida) <i>N. N. Rimskaya-Korsakova, E. N. Temereva, V. V. Malakhov</i>	406
Restructuring of the Optokinetic Reflex During Metamorphosis in <i>Pelobates fuscus</i> Laur. <i>E. I. Kiseleva, O. Yu. Orlov, V. A. Bastakov</i>	411
The Role of Recombinant Glycodelin in the Differentiation of Regulatory T-lymphocytes <i>K. Yu. Shardina, V. P. Timganova, M. S. Bochkova, P. V. Khramtsov, M. B. Rayev, S. A. Zamorina</i>	417
Comparative Study of Plutonium and Radiocesium in Muscle of Fish of the Yenisei River <i>T. A. Zotina, M. S. Melgunov, D. V. Dementyev, Yu. V. Alexandrova</i>	422
Maternal Methyl-Enriched Diet Increases Dopaminergic Tone of the Mesolimbic Brain System in Adult Offspring of WAG/Rij Rats <i>K. Yu. Sarkisova, E. A. Fedosova, A. B. Shatskova, V. B. Narkevich, V. S. Kudrin</i>	427
The First Experience of Keeping Pogonophorans (Annelida: Siboglinidae) in the Laboratory <i>A. A. Prudkovsky, N. P. Karaseva, M. N. Rimskaya-Korsakova, T. P. Pimenov, N. N. Rimskaya-Korsakova, V. V. Malakhov</i>	423

---

УДК 612.115.3

## УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА

© 2022 г. М. Е. Григорьева<sup>1,\*</sup>, академик РАН Н. Ф. Мясоедов<sup>2</sup>, Л. А. Ляпина<sup>1</sup>

Поступило 22.04.2022 г.

После доработки 06.06.2022 г.

Принято к публикации 10.06.2022 г.

В экспериментах на крысах изучено участие оксида азота в реакциях системы гемостаза на появление в крови ряда пролинсодержащих пептидов. Показано, что однократное интраназальное введение пептидов RGP, RPGP и RGPL крысам приводило к повышению фибринолитического, антикоагулянтного и антитромбоцитарного потенциала крови. Применение неселективного блокатора NO-синтазы L-NAME практически полностью ингибировало противосвертывающие эффекты эффектов глипролинов (глицил-пролил-содержащие пептиды). Установлен механизм антикоагулянтно-фибринолитического и антитромбоцитарного действия пептидов глипролинового ряда, обусловленный активацией ферментативного пути образования оксида азота. Полученные результаты позволили выявить участие оксида азота в реализации гемостатических и сосудисто-эндотелиальных функций организма.

**Ключевые слова:** оксид азота, L-NAME, пептиды глипролинового ряда, система гемостаза, сосудисто-эндотелиальная функция

**DOI:** 10.31857/S2686738922050092

Продуцируя различные биологически активные вещества, сосудистый эндотелий играет существенную роль в реализации регуляторных влияний в организме. Одним из важнейших синтезируемых эндотелием соединений является оксид азота (NO), который принимает участие в регуляции сосудистого тонуса, системы гемостаза и других физиологических систем. NO является вазодилататором, ингибитором агрегации тромбоцитов и модулирует высвобождение тканевого активатора плазминогена эндотелиальными клетками, способствует нормальному кровотоку и улучшает реологические свойства крови, что позволяет рассматривать его как значимый агент для сердечно-сосудистой системы [1–3].

Одним из основных механизмов действия NO в организме является активирование кальциевых каналов через стимуляцию цГМФ. При этом в тромбоцитах и гладких мышцах уменьшается содержание ионов кальция, принимающего активное участие во всех фазах процесса свертывания

крови [2, 4]. Итогом этого являются антитромбоцитарный, противосвертывающий и вазодилаторный эффекты NO.

В организме NO образуется из L-аргинина в ходе комплексной окислительной реакции, катализируемой группой белков (ферментов) – NO-синтазами [4, 5].

В физиологических условиях сосудистый эндотелий проявляет защитное действие по отношению к гомеостазу сосудов путем его регуляции [6]. Однако при многих патологических состояниях, в том числе осложняющихся повышенной свертываемостью крови (артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые, неврологические заболевания, метаболический синдром, сахарный диабет и др.), имеет место повреждение эндотелия и нарушаются синтез и выделение NO и возникает дисфункция эндотелия [7]. В связи с этим большую актуальность приобретает проблема нарушения при этом функционирования многих систем организма, в том числе и свертывания крови.

Ранее было показано, что пролинсодержащие пептиды оказывают антикоагулянтно-фибринолитические эффекты в плазме крови и снижают агрегацию тромбоцитов [8]. Пептиды глипролинового ряда в значительной степени активируют выброс в кровоток продуктов распада (нитратов/нитритов) оксида азота, что свидетельствует

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

<sup>2</sup> НИЦ “Курчатовский институт” – Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

о его повышенном синтезе из эндотелия [9]. Однако до сих пор в проблеме о влиянии регуляторных пептидов на сосудистый эндотелий отсутствуют систематизированные данные.

Поскольку основным путем возникновения оксида азота в организме считается его синтез из L-аргинина NO-синтазами (NOS) [5, 10], представляло интерес изучить возможность участия оксида азота в реакциях системы гемостаза на появление в крови ряда пролинсодержащих пептидов в эксперименте.

Исходя из этого цель настоящей работы заключалась в выявлении влияния пептидов глипролинового ряда Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu и Arg-Pro-Gly-Pro на изменение параметров первичного и плазменного гемостаза на фоне предварительной блокады NOS в эксперименте на крысах.

Использовали препараты пептидов Pro-Gly-Pro (PGP), Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) и Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL), синтезированные в Институте молекулярной генетики (ИМГ) РАН. Для блокады NOS применяли неселективный N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME, Sigma, США) в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно предварительно за 60 мин до последнего взятия крови. Доза и время введения блокатора выбраны на основании работ, проводимых другими исследователями [11].

Исследования были разрешены Локальным этическим Комитетом по биомедицинским исследованиям ИМГ РАН (протокол № 2 от 04.06.2019) и проводились с соблюдением этических принципов работы с животными в соответствии с международной Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте. Животные были получены из питомника “Столбовая” Московской области и содержались в стандартных условиях вивария на стандартном лабораторном рационе (стандартный гранулированный корм “Лабораторкорм”, Россия, калорийность 2950 ккал/кг).

В экспериментах было использовано 60 лабораторных белых крыс-самцов линии Wistar, разделенных на несколько групп: I группа (Опыт 1) включала 3 подгруппы (по 8 крыс в каждой), животным которых интраназально однократно вводился один из пептидов в дозе 100 мкг/кг на фоне предварительной (за 30 мин) внутрибрюшинной инъекции 0.85%-го NaCl; II группа (Опыт 2) также включала 3 подгруппы (по 8 крыс в каждой), животным которых интраназально однократно вводился один из пептидов в той же дозе на фоне предварительной (за 30 мин) инъекции L-NAME; III группа (Контроль, 8 крыс), которой вместо всех препаратов аналогичным образом в те же сроки вводился 0.85%-ный NaCl. Дозы пептидов

выбраны на основании ранее проведенных нами исследований [8].

Взятие крови для исследования биохимических показателей осуществляли у животных нотошак из *v. jugularis* через 30 мин после последнего введения препаратов, т.е. через 60 мин после введения L-NAME. У 8 крыс группы Опыт 2 выборочно забирали кровь перед введением пептидов, т.е. через 30 мин после применения L-NAME. В качестве консерванта использовали 3.8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении кровь: консервант как 9:1.

В богатой тромбоцитами плазме после центрифугирования крови при 250 г в течение 5 мин исследовали агрегацию тромбоцитов (АТ), индуцированную  $10^{-6}$  М АДФ, по турбодиметрическому методу *Born* на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (BIOLA, Россия); в бедной тромбоцитами плазме, полученной после центрифугирования крови при 1200 г в течение 10 мин, определяли параметры плазменного гемостаза – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), суммарную (СФА), ферментативную (ФФА) и неферментативную (НФА) фибринолитическую активность на нестабилизированных пластинах фибрина [12].

Статистический анализ данных выполняли с помощью пакета статистических программ STATISTIKA 8.0 (StatSoft Inc., США). Оценку нормальности эмпирических распределений проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределение данных отличалось от нормального, применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

В наших экспериментах однократное интраназальное введение всех исследованных пептидов без предварительного применения L-NAME (Опыт 1) приводило к возрастанию фибринолитической и антикоагулянтной активности крови и снижению агрегации тромбоцитов, вызванной АДФ. Было установлено повышение СФА на 40, 75 и 20% через 30 мин после введения PGP, RPGP и PGPL соответственно, что связано с увеличением в плазме крови как ФФА на 20, 95 и 50%, так и НФА на 50, 65 и 15% по сравнению с контрольными показателями (табл. 1). Одновременно с этим после применения PGP, RPGP и PGPL увеличивалась антикоагулянтная активность плазмы крови (по тесту АЧТВ) на 22, 30 и 10%, а также снижение АТ на 30, 18 и 12% относительно контрольных показателей. Практически все изменения исследуемых параметров гемостаза были достоверными, однако после введения PGPL наблюдалась лишь тенденция к повышению НФА и АЧТВ.

**Таблица 1.** Изменение параметров гемостаза через 30 мин после интраназального введения пептидов на фоне NaCl (Опыт 1) или L-NAME (Опыт 2) ( $M \pm m$ )

Условия опыта	СФА, мм <sup>2</sup>	НФА, мм <sup>2</sup>	ФФА, мм <sup>2</sup>	АЧТВ, с	АТ, индекс
Опыт 1 (RPGP), $n = 8$	52.5 ± 0.3**	33.0 ± 0.3**	19.5 ± 0.5**	43.6 ± 2.8**	1.4 ± 0.10*
Опыт 1 (PGPL), $n = 8$	36.0 ± 0.3*	23.0 ± 0.2	15.0 ± 0.2**	36.9 ± 0.6	1.5 ± 0.08*
Опыт 1 (PGP), $N = 8$	42.0 ± 0.5**	30.0 ± 0.3**	12.0 ± 0.2*	40.9 ± 1.1**	1.2 ± 0.12**
Опыт 2 (RPGP), $n = 8$	34.4 ± 1.1##	20.2 ± 0.9##	14.2 ± 0.7##	31.3 ± 4.8##	1.7 ± 0.14##
Опыт 2 (PGPL), $n = 8$	30.0 ± 0.9#	20.0 ± 0.9#	10.0 ± 0.5#	30.8 ± 1.7##	1.7 ± 0.14#
Опыт 2 (PGP), $n = 8$	30.0 ± 0.6##	21.3 ± 0.7##	8.7 ± 0.5#	31.2 ± 2.6##	1.6 ± 0.07##
Контроль (NaCl + NaCl), $n = 8$	30.0 ± 1.0	20.0 ± 0.7	10.0 ± 0.4	33.5 ± 1.1	1.7 ± 0.10

$n$  – количество крыс в каждой группе. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  при сравнении показателей опытных групп по сравнению с таковыми в контрольной группе, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  при сравнении показателей соответствующих групп Опыта 2 (L-NAME + пептид) и Опыта 1 (NaCl + пептид). СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФА – неферментативная фибринолитическая активность, ФФА – ферментативная фибринолитическая активность, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, АТ – агрегация тромбоцитов.

Следующей группе крыс (Опыт 2) с целью неселективной блокады NOS вводили L-NAME за 30 мин до интраназального однократного применения одного из пептидов. На фоне предварительного использования блокатора исследование фибринолитического фона плазмы крови показало увеличение СФА на 14.6% и ФФА на 42% (в отличие от НФА) относительно контрольных показателей только после введения RPGP. Показатели фибринолитической активности крови животных, которым вводили два других пептида, практически не отличались от соответствующих показателей контрольной группы крыс.

Аналогичные тенденции были установлены при анализе антикоагулянтной активности и агрегатного состояния крови после применения всех исследованных пептидов на фоне предварительного введения L-NAME, а именно: показатели АЧТВ и АТ были сравнимы с соответствующими показателями у контрольной группы животных. При этом исследуемые показатели гемостаза в группе крыс, которым вводился каждый из пептидов на фоне предварительной блокады NOS L-NAME (Опыт 2), достоверно отличались от наблюдаемых параметров при введении только пептидов (Опыт 1).

Необходимо отметить, что внутрибрюшинное применение L-NAME само по себе оказывает влияние на систему гемостаза в сторону повышения свертываемости крови, в основном за счет выраженного состояния гипофибринолиза. Происходило снижение СФА, НФА и ФФА на 25–40% относительно контрольных значений. При этом практически не наблюдалось изменений в антикоагулянтном звене гемостаза и влияния на агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, предварительное введение блокатора NOS L-NAME практически полностью снимало фибринолитическое, антикоагу-

лянтное и антитромбоцитарное действие всех исследованных пептидов в организме здоровых крыс.

В связи с ростом сердечно-сосудистых и других заболеваний, связанных с нарушением функций сосудистого эндотелия, большую актуальность в настоящее время приобретает проблема изучения механизмов свертывания крови в условиях дисфункции эндотелия. Дисфункция эндотелия, как наиболее ранняя фаза повреждения сосуда, связана с дефицитом синтеза оксида азота [1].

Оксид азота обладает широким диапазоном действия, в том числе принимает участие в реализации ряда физиологических функций организма – нейротрансмиссии, ингибировании свертывания крови, регуляции тонуса мелких и средних кровеносных сосудов и структурных изменений сосудистой стенки. Продуцируемый эндотелиальной изоформой NOS оксид азота является физиологически значимым вазодилататором, ингибитором агрегации тромбоцитов и индуктором тканевого активатора плазминогена [1, 6].

Субстратом для группы ферментов NOS, под действием которых в ходе комплексной окислительной реакции образуется оксид азота, является L-аргинин. Появление в кровотоке этой аминокислоты улучшает реологические свойства крови, активизирует фибринолиз, антикоагулянтную и антитромбоцитарную активность [11].

Известно также, что пролинсодержащие пептиды обладают эндотелий-зависимой реакцией экскреции в кровотоке тканевого активатора плазминогена (ТАП), который участвует в процессах ферментативного фибринолиза. Кроме того, короткие регуляторные пептиды оказывают анти-тромбоцитарный и антикоагулянтный эффекты в организме [8, 13]. Доказана защитная роль пептидов глипролинового ряда при нарушениях функ-

ции гемостаза [14, 15]. Они в условиях моделирования у крыс МС способствовали увеличению в крови маркеров продуцирующей функции эндотелия в сторону противосвертывающих механизмов, а именно, возрастанию активности ТАП и уровня конечных метаболитов оксида азота, что свидетельствует о повышенном его синтезе из эндотелия [9].

В настоящем исследовании в экспериментах на крысах изучали участие оксида азота в реакциях системы гемостаза на появление в крови ряда пролинсодержащих пептидов. Нами было показано, что однократное интраназальное введение пептидов PGP, RPGP и PGPL крысам приводило к повышению фибринолитического, антикоагулянтного и антитромбоцитарного потенциала крови. Применение неселективного блокатора NOS L-NAME практически полностью ингибировало противосвертывающие эффекты эффектов глипролинов.

Таким образом, на основании полученных результатов было установлено, что механизм антикоагулянтно-фибринолитического действия и снижение агрегации тромбоцитов под влиянием пептидов глипролинового ряда в значительной степени связаны с образованием оксида азота. Подобным образом за счет активации NOS происходило увеличение образования NO и в других условиях, а именно при гипокинезии крыс. Так, в экспериментах авторов [16] было установлено, что применение L-NAME подавляет эффект активации синтеза NO в условиях ограничения двигательной активности до уровня, значительно ниже значения у контрольных животных [16]. Перспективность исследований проблемы NO при развитии патологических состояний связана с тем, что в организме при этом может наблюдаться либо гиперпродукция оксида азота, либо снижение его генерации [10, 17].

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют раскрыть роль оксида азота в функционировании не только системы гемостаза, но и в механизмах формирования и развития многих физиологических и патологических состояний организма, в том числе обусловленных изменениями в реологии крови и сосудисто-эндотелиальной функции.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выносят благодарность сотруднику Института молекулярной генетики РАН Андреевой Людмиле Александровне за синтез пептидов.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giannarelli C., De Negri F, Viridis A., et al.* Nitric oxide modulates tissue plasminogen activator release in normotensive subjects and hypertensive patients // *Hypertension*. 2007. V. 49. № 4. P. 878–884.
2. *Гайнуллина Д.К., Софронова С.И., Тарасова О.С.* Эндотелий и оксид азота // *Природа*. 2014. № 9. С. 3–10.
3. *Беловол А.Н., Князькова И.И.* Функция эндотелия: фокус на оксид азота // *Здоровье Украины*. 2012. № 4. С. 50–51.
4. *Лупинская З.А., Зарифьян А.Г., Гурович Т.Ц., Шлейфер С.Г.* Эндотелий, функция и дисфункция. Б.: КРСУ, 2008. 373 с.
5. *Daff S.* NO synthase: structures and mechanisms // *Nitric Oxide*. 2010. V. 23. № 1. P. 1–11.
6. *Rodríguez C., Slevin M., Rodríguez-Calvo R., et al.* Modulation of endothelium and endothelial progenitor cell function by low-density lipoproteins: implication for vascular repair, angiogenesis and vasculogenesis // *Pathobiology*. 2009. V. 76. № 1. P. 11–22.
7. *Brzoska T., Tanaka-Murakami A., Suzuki Y., et al.* Endogenously generated plasmin at the vascular wall injury site amplifies lysine binding site-dependent plasminogen accumulation in microthrombi // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. P. e0122196.
8. *Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. и др.* Пептидная регуляция метаболических процессов при гиперхолестеринемических состояниях организма // *Известия РАН. Сер. Биол.* 2015. № 6. С. 634–644.
9. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю.* Регуляция глипролинами первичного гемостаза и сосудисто-эндотелиальной функции организма при метаболическом синдроме // *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2019. Т. 79. № 3. С. 32–38.
10. *Forstermann U., Sessa W.C.* Nitric oxide synthases: regulation and function // *European Heart Journal*. 2012. V. 33. P. 829–837.
11. *Vitecek J., Lojek A., Valacchi G., Kubala L.* Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges // *Mediators of Inflammation*. 2012. V. 2012. P. 22.
12. *Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А.* Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
13. *Rengasamy K.R., Khan H., Ahmad I., et al.* Bioactive peptides and proteins as alternative antiplatelet drugs // *Med. Res. Rev.* 2019. V. 39. № 6. P. 2153–2171.
14. *Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., et al.* Mechanism for glyproline protection in hypercholes-



- terolemia // Pathophysiology. 2016. V. 23. № 1. P. 27–33.
15. Григорьева М.Е., Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А. и др. Состояние системы гемостаза при действии пролинсодержащих пептидов в условиях развития экспериментального метаболического синдрома // ДАН. 2018. Т. 479. № 1. С. 88–91.
16. Zaripova R.I., Gainutdinov Kh.L., Zefirov T.L. The effect of NO-synthase blockade on the production of nitric oxide in the hearth of rats with hypokinesia // Bull. Experim. Biol. Med. 2014. V. 157. № 5. P. 554–556.
17. Godo S., Shimokawa H. Endothelial Functions // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2017. V. 37. № 9. P. e108–e114.

## PARTICIPATION OF NITRIC OXIDE IN THE REALIZATION OF HEMOSTATIC GLYPROLINE PEPTIDES EFFECTS

**M. E. Grigorieva<sup>a, #</sup>, Academician of the RAS N. F. Myasoedov<sup>b</sup>, and L. A. Lyapina<sup>a</sup>**

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

<sup>b</sup> *Research Center “Kurchatov Institute” – Institute of Molecular Genetics of the RAS, Moscow, Russian Federation*

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

The participation of nitric oxide in the reactions of the hemostasis system to the appearance of proline-containing peptides in the blood was studied in experiments on rats. It was shown that a single intranasal administration of peptides PGP, RPGP and PGPL to rats led to an increase in fibrinolytic, anticoagulant and antiplatelet potential of blood. The use of the non-selective NO-synthase blocker L-NAME almost completely inhibited the anticoagulant effects of the glyprolines. Has been established that the mechanism of anticoagulant-fibrinolytic and antiplatelet action of glyproline peptides caused by activation of the enzymatic pathway of nitric oxide formation. The obtained results revealed the participation of nitric oxide in the implementation of hemostatic and vascular-endothelial functions of the organism.

*Keywords:* nitric oxide, L-NAME, glyproline peptides, hemostasis system, vascular endothelial

УДК 577.21

## КОМПЛЕКС TAG7-MTS1 ВЫЗЫВАЕТ ХЕМОТАКСИС РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2022 г. О. К. Иванова<sup>1,\*</sup>, Т. Н. Шарапова<sup>1</sup>, Е. А. Романова<sup>1</sup>, Л. П. Сашенко<sup>1</sup>, Д. В. Яшин<sup>1</sup>, академик РАН Г. П. Георгиев<sup>1</sup>

Поступило 22.05.2022 г.

После доработки 02.06.2022 г.

Принято к публикации 10.06.2022 г.

Одним из фундаментальных свойств иммунной системы является способность сохранять баланс между активацией и подавлением эффекторных свойств лимфоцитов. Ключевую роль в этом процессе играет субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов. Нарушение их функциональной активности лежит в основе многих онкологических и аутоиммунных заболеваний, и поэтому изучение их свойств чрезвычайно важно для разработки новых терапевтических подходов. В данной работе мы показали, что регуляторные Т-лимфоциты способны мигрировать по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1, а также вырабатывать вещества, вызывающие миграцию клеток крови.

**Ключевые слова:** регуляторные Т-лимфоциты, хемотаксис, Tag7, Mts-1

**DOI:** 10.31857/S2686738922050110

В 1996 г. в нашем институте был описан ген нового белка Tag7 (также известного как пептидогликан-распознающий белок 1 PGLYRP1 или PGRP-S) [1]. Он принадлежит к консервативному семейству белков, обнаруженных у различных организмов от насекомых до млекопитающих. Данные белки распознают уникальный компонент клеточной стенки бактерий – пептидогликан [2]. Было показано, что у насекомых Tag7 участвует в антибактериальной защите организма посредством активации Toll-рецепторов [3]. У млекопитающих данный белок является компонентом врожденного иммунитета, участвует в фагоцитозе нейтрофилов [4], а также в комплексе с белком теплового шока Hsp70 активирует Т-лимфоциты и играет важную роль в противоопухолевой защите [5].

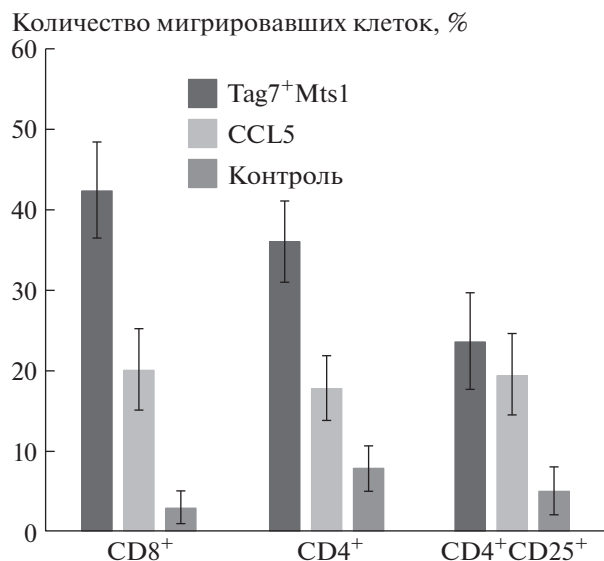
Помимо Hsp70, Tag7 способен связываться с Ca<sup>2+</sup>-связывающим белком метастазин-1 (Mts1 или S100A4). Наиболее изученной функцией Mts1 является участие в метастазировании опухолевых клеток [6], однако, он экспрессируется и в нормальных клетках организма, включая фибробласты, лимфоциты и макрофаги. В нашей лаборатории было показано, что комплекс Tag7–Mts1 способен вызывать направленную мигра-

цию лимфоцитов человека по градиенту концентрации (хемотаксис) [7]. Этот процесс играет важную роль в развитии иммунного ответа, воспалительных реакций, а также в патогенезе инфекционных и онкологических заболеваний.

Одной из субпопуляций лимфоцитов, осуществляющих координацию иммунного ответа, являются регуляторные Т-клетки (Treg). Основная их функция заключается в подавлении аутоиммунных реакций. Нарушение баланса созревания и активации этих клеток лежит в основе патогенеза таких болезней, как ревматоидный артрит, псориаз и системная красная волчанка [8]. Впервые регуляторные Т-клетки были описаны как лимфоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, подавляющие развитие аутоиммунных заболеваний у мышей [9]. Позже было обнаружено, что для нормального созревания и функционирования Т-регуляторным лимфоцитам необходим транскрипционный фактор FoxP3. Он обеспечивает их супрессивные свойства, стимулируя экспрессию генов *IL2Ra*, *CTLA4* и *TNFRsf18*. Также FoxP3 подавляет экспрессию эффекторных цитокинов, в т.ч. IL4, IFN $\gamma$ , и активность циклической нуклеотидной фосфодиэстеразы 3B (PDE3B), поддерживая необходимый гомеостаз в Т-регуляторных клетках [10]. Однако в экспериментах по идентификации и сортировке Treg оказалось, что среди FoxP3<sup>+</sup> клеток встречаются также лимфоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Поиск более специфичных маркеров для регуляторных Т-лимфоцитов привел к открытию обратной корреляции между экс-

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

\*e-mail: olga.k.ivanova@gmail.com



**Рис. 1.** CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоциты способны мигрировать по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1 и CCL5.

прессией FoxP3 и рецептора IL7 (CD127). Было показано, что более 85% клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-(Lo)</sup> экспрессируют FoxP3 [11]. При проверке супрессивных свойств клетки CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> продемонстрировали свою высокую эффективность [12]. Таким образом, использование указанных трех маркеров позволяет с точностью более 85% идентифицировать регуляторные Т-лимфоциты в периферической крови методом проточной цитофлуориметрии. Изучение свойств Treg клеток представляет большой интерес в свете новых данных об их участии в противоопухолевом иммунном ответе, заживлении ран, аллергии на пищу и других процессах организма.

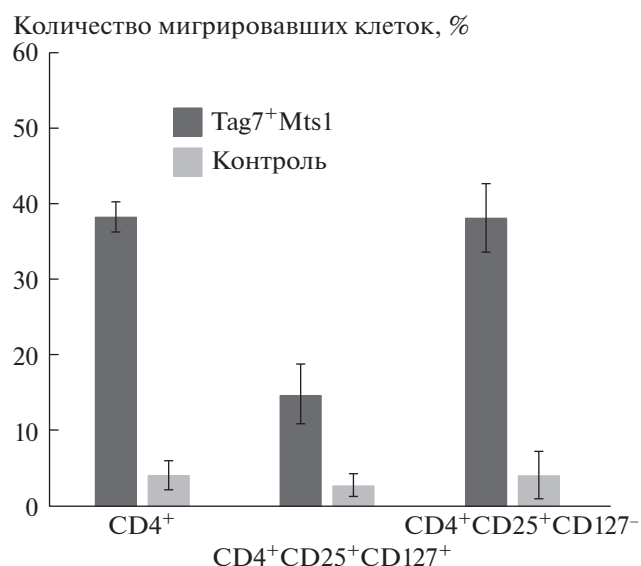
Целью данной работы было исследовать способность регуляторных Т-клеток к хемотаксису по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1, а также выяснить, выделяют ли они данный комплекс в среду инкубации.

Лимфоциты получали из лейкомассы здоровых доноров путем центрифугирования на градиенте фикола по стандартной методике. Все доноры подписывали добровольное согласие, материал был принят в работу анонимно. CD4<sup>+</sup> (рис. 1) и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (рис. 2) субпопуляции лимфоцитов выделяли с использованием наборов с магнитными шариками Dynabeads (Invitrogen, США). Хемотаксис проводили в камерах HTS Transwell (96 лунок, полиэфирная мембрана, поры 8 мкм, производство Corning, США) в среде RPMI без сыворотки при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажности. В качестве хемоаттрактантов использовали комплекс Tag7-Mts1 в концентрации 10<sup>-7</sup> М и CCL5

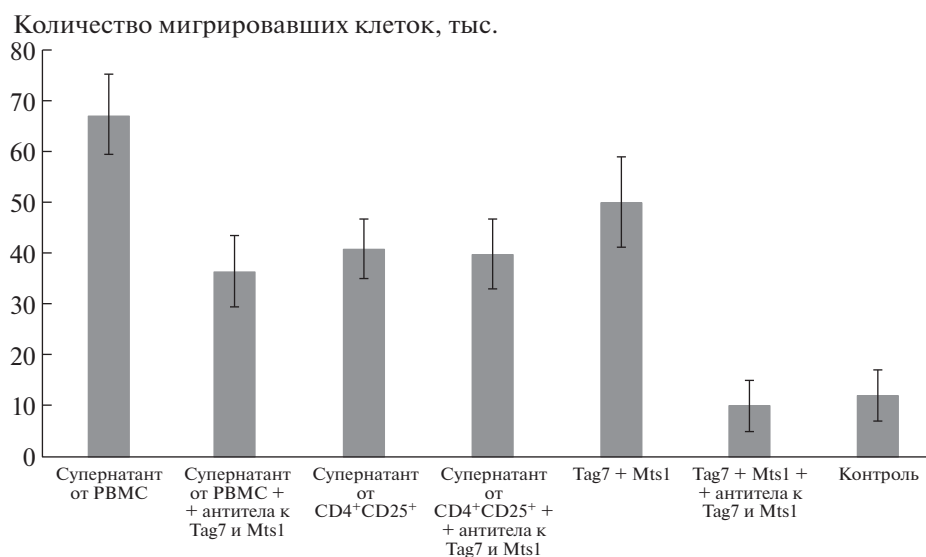
(R&D Systems, США) в концентрации 5 × 10<sup>-9</sup> М. Для образования комплекса Tag7 смешивали с Mts1 в соотношении 1:2 и инкубировали 1 ч. В качестве отрицательного контроля использовали среду RPMI без сыворотки. Через 18 ч после нанесения в хемотактическую камеру подсчитывали количество клеток, оказавшихся в нижней ячейке, с использованием набора MTT (Abscam, Великобритания), а фенотип мигрировавших клеток определяли на проточном цитофлуориметре Cytotflex (Beckman Coulter Life Sciences, США). Для проточной цитофлуориметрии были использованы следующие антитела: антитела к CD8 и CD4 производства Invitrogen, США, антитела к CD25 производства Biolegend, США, антитела к CD127 производства Beckman Coulter, США. В эксперименте с кондиционированной средой (рис. 3) ингибиторные антитела к Tag7 (Invitrogen, США) и Mts1 (ThermoScientific, США) добавляли в нижнюю ячейку хемотактической камеры за час до начала инкубации общей лимфоцитарной фракции с супернатантами. Долю мигрировавших клеток для каждой из субпопуляций рассчитывали как (общее количество клеток в нижней камере × процент данной популяции по данным цитофлуориметрии) / (общее количество клеток, нанесенных в верхнюю камеру × процент данной популяции в исходной смеси клеток по данным цитофлуориметрии) × 100%. На рисунках представлены данные не менее трех независимых экспериментов как среднее ± стандартное отклонение. Для статистической обработки использовали пакет SigmaPlot (Systat Software Inc, Великобритания).

На первом этапе работы мы проанализировали способность CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов к миграции по градиенту концентрации хемоаттрактивных веществ. Для этого мы провели хемотаксис общей фракции лимфоцитов и определили фенотип мигрировавших клеток с помощью проточного цитофлуориметра. Ранее в нашей лаборатории уже было показано, что комплекс Tag7-Mts1 вызывает миграцию лимфоцитов [7]. В данной работе мы в качестве хемоаттрактантов использовали как комплекс Tag7-Mts1, так и классический хемокин CCL5 в качестве положительного контроля (рис. 3). Оба использованных нами хемотактических агента индуцировали клеточную миграцию.

Было обнаружено, что значительная часть CD8<sup>+</sup> клеток активно отвечала на хемоаттрактанты. Как субпопуляция CD4<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> активированные клетки также мигрировали в присутствии хемоаттрактантов интенсивнее, чем без них. Причем мы наблюдали миграцию клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и в ответ на CCL5, и в ответ на комплекс Tag7-Mts1.



**Рис. 2.** CD127<sup>-</sup> T-регуляторные лимфоциты более активно мигрируют в ответ на градиент концентрации комплекса Tag7-Mts1, чем субпопуляция CD127<sup>+</sup>.



**Рис. 3.** Tag7 и Mts1 не играют роль хемоаттрактантов в Treg-индуцированном хемотаксисе.

Для более точной идентификации T-регуляторных лимфоцитов мы проанализировали негативный профиль экспрессии маркера CD127. Для этого мы предварительно выделяли фракцию CD4<sup>+</sup> клеток с помощью магнитных шариков Dynabeads, затем наносили эти клетки в камеру Transwell и мигрировавшие клетки исследовали на проточном цитофлуориметре (рис. 2). Мы обнаружили существенную разницу в миграции клеток, экспрессирующих маркер CD127, и без него. Клетки с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>, которые и считаются регуляторными Treg лимфо-

цитами, были значительно более активны в ответ на градиент концентрации комплекса Tag7 и Mts1, чем клетки CD127<sup>+</sup>. Таким образом, было показано, что регуляторные лимфоциты способны к хемотаксическому движению под действием Tag7-Mts1 комплекса.

Хорошо известно, что одной из важнейших функций CD4<sup>+</sup> клеток является выработка различных веществ, воздействующих на другие клетки иммунной системы. Для того чтобы выяснить, вырабатывают ли регуляторные T-лимфоциты хе-

моаттрактанты, и, в частности, комплекс Tag7-Mts1, мы провели эксперимент с супернатантами. Была подготовлена среда, кондиционированная CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клетками (как описано в [7]), и добавлена в нижнюю ячейку хемотактической камеры. В верхнюю ячейку поместили общую лейкоцитарную фракцию. Важно отметить, что никакой предварительной активации клеток проведено не было. В качестве положительного контроля была использована среда – супернатант от общей фракции мононуклеарных клеток (рис. 3). Среда, кондиционированная как общей лейкоцитарной, так и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> фракцией, вызвала миграцию значительного количества лимфоцитов.

При добавлении к супернатантам ингибирующих антител к Tag7 и Mts1 активность миграции лимфоцитов снижалась в ячейках, где в качестве стимулятора выступал супернатант от общей фракции лимфоцитов, а в случае супернатанта от клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> никаких изменений мы не обнаружили. Полученные в данном эксперименте результаты указывают на то, что CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-клетки способны вызывать хемотаксис, однако, Tag7 и Mts1 в этом процессе не участвуют. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в среде, кондиционированной общей лейкоцитарной фракцией, присутствует комплекс Tag7-Mts1 [7]. Можно предположить, что основной вклад в экспрессию данного комплекса вносят клетки CD8<sup>+</sup>, а T-регуляторные клетки, по всей видимости, его в среду инкубации не выделяют.

Комплекс Tag7-Mts1 занимает особое место среди хемоаттрактантов. Он не имеет специфической для классических хемокинов третичной структуры (“греческого ключа”), однако, несмотря на это, способен активировать движение лимфоцитов. Ранее мы показали, что данный комплекс способен вызывать миграцию NK и T-клеток. Моноциты и нейтрофилы в ответ на градиент концентрации данного комплекса не проявили способности к движению [7]. В данной работе мы обнаружили, что регуляторные T-лимфоциты с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> способны к хемотаксическому движению по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1. При этом, по всей видимости, сами регуляторные T-лимфоциты данный комплекс не экспрессируют, а вырабатывают другие молекулы с хемоаттрактивными свойствами.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Геномное редактирование” Федерального государственного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ЦКП ИБГ РАН).

#### ИНФОРМАЦИЯ О КОНФЛИКТЕ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России в рамках проекта (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021 г.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кустикова О.С., Киселев С.Л., Бородулина О.Р., и др. Клонирование гена Tag7, экспрессирующегося в метастазирующих опухолях мыши // Генетика. 1996. Т. 32. № 5. С. 621–628.
2. Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) // Mol. Immunol. 2004. V. 40. № 12. P. 877–886.
3. Werner T., Liu G., Kang D., et al. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 13772–13777.
4. Cho J.H., Fraser I.P., Fukase K., et al. Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity // Blood. 2005. V. 106. № 7. P. 2551–2558.
5. Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., et al. Peptidoglycan recognition protein tag7 forms a cytotoxic complex with heat shock protein 70 in solution and in lymphocytes // J. Biol. Chem. 2004. V. 9. № 279. P. 2117–2124.
6. Grigorian M., Ambartsumian N., Lykkesfeldt A.E., et al. Effect of mts1 (S100A4) expression on the progression of human breast cancer cells // Int. J. Cancer. 1996. V. 67. P. 831–841.
7. Dukhanina E.A., Lukyanova T.I., Romanova E.A., et al. A new role for PGRP-S (Tag7) in immune defense: lymphocyte migration is induced by a chemoattractant complex of Tag7 with Mts1 // Cell Cycle. 2015. V. 14. № 22. P. 3635–3643.
8. Sharma A., Rudra D. Emerging functions of regulatory T-cells in tissue homeostasis // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 883.
9. Asano M., Toda M., Sakaguchi N., et al. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. // J. Exp. Med. 1996 V. 184. P. 387–396.
10. Georgiev P., Charbonnier L.M., Chatila T.A. Regulatory T cells: the many faces of Foxp3. // J. Clin. Immunol. 2019. V. 39. № 7. P. 623–640.
11. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells // J. Exp. Med. 2006. V. 203. № 7. P. 1701–1711.
12. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. // J. Exp. Med. 2006 V. 203. № 7. P. 1693–700.

## **TAG7-MTS1 COMPLEX ACTIVATES CHEMOTAXIS OF REGULATORY T-LYMPHOCYTES**

**O. K. Ivanova<sup>a,#</sup>, T. N. Sharapova<sup>a</sup>, E. A. Romanova<sup>a</sup>, L. P. Sashchenko<sup>a</sup>, D. V. Yashin<sup>a</sup>,  
and Academician of the RAS G. P. Georgiev<sup>a</sup>**

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

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

One of the basic features of immune system is the ability to sustain balance between activation and suppression of effector lymphocytes. In this process a key role belongs to the subpopulation of cells called regulatory T-lymphocytes (Treg). Many cancer and autoimmune diseases are caused by malfunctions of Treg, and investigation of this subpopulation is important for development of new therapeutic approaches. In this study we demonstrate that regulatory T-lymphocytes can migrate along the concentration gradient of Tag7-Mts1 complex, and also they produce agents that induce blood cells migration.

*Keywords:* regulatory T-lymphocytes, chemotaxis, Tag7, Mts1

УДК 577.3:599.323.4

## ВЛИЯНИЕ КСИЛАЗИН-ЗОЛЕТИЛОВОЙ АНЕСТЕЗИИ НА РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ ТОТАЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ РЕНТГЕНОВСКИМ ИЗЛУЧЕНИЕМ, ПРОТОНАМИ И ИОНАМИ УГЛЕРОДА

© 2022 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин<sup>1,\*</sup>, О. М. Розанова<sup>2</sup>,  
Е. Н. Смирнова<sup>2</sup>, Т. А. Белякова<sup>1</sup>, Н. С. Стрельникова<sup>1</sup>

Поступило 06.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принято к публикации 20.05.2022 г.

Изучено влияние ксилазин-золетиловой анестезии на радиочувствительность мышечной ткани при облучении протонами, ионами углерода в двух областях кривой Брэгга и рентгеновским излучением по критериям 30-дневной выживаемости, динамики гибели, средней продолжительности жизни погибших мышечных тканей. Максимальное влияние анестезии в 3.3 раза наблюдали по снижению гибели мышечных тканей при облучении ионами углерода в пике Брэгга, при облучении до пика это влияние составляло 1.2 раза. При облучении протонами в пике Брэгга защитное действие анестезии в 1.7 раза наблюдалось только в дозе 8.5 Гр. При облучении мышечной ткани рентгеновским излучением в дозах 6.0–8.5 Гр коэффициент влияния анестезии составлял 1.7–2. С помощью метода 30-дневной выживаемости показано, что применение ксилазин-золетил смеси существенно изменяет радиочувствительность мышечной ткани в зависимости от дозы облучения и качества источника излучения.

*Ключевые слова:* протоны, ионы углерода, кривая Брэгга, мышцы, выживаемость, золетил-ксилазиновая анестезия

**DOI:** 10.31857/S2686738922050043

В последнее время в связи с использованием ускоренных заряженных частиц для терапии рака, требующей высокоточного контроля позиционирования пациентов, возникает необходимость использования анестезии [1]. Анестезия оказывает действие на многие физиологические параметры, которые влияют как на результат лечения, так и на радиочувствительность организма. Наблюдаемые эффекты зависят от состава анестезирующей смеси, концентрации, режима введения, вида и возраста животных, критерия регистрации поражения, диапазона доз при тотальном или локальном облучении. Основная часть исследований проведена с использованием фотонных излучений с низкими значениями линейной потери энергии (ЛПЭ) [2], тогда как уско-

ренные заряженные частицы характеризуются высокими значениями ЛПЭ особенно в пике Брэгга, где происходит максимальное выделение энергии в конце пробега частиц. Биологическое действие протонов и ионов углерода, которые чаще всего используются в адронной терапии, в значительной степени зависит не только от дозы, но и от ЛПЭ [3, 4], поэтому для решения практических задач новых видов радиотерапии необходимо исследование радиочувствительности объектов в разных областях кривой Брэгга, которая характеризуется изменением ЛПЭ в зависимости от расстояния, пройденного через вещество. Актуальным является также поиск новых безопасных способов иммобилизации животных не только для точного позиционирования в определенных координатах, но и для снижения движений, связанных с дыханием [5].

Другой областью, для которой исследование биологического действия заряженных частиц имеет важное значение, является освоение дальнего космоса. Наиболее опасными для человека являются галактические космические лучи, состоящие примерно из 87% протонов высокой энергии, 12% альфа-частиц и 1% более тяжелых ионов. До сих пор оценка радиационного риска

<sup>1</sup> Филиал «Физико-технический центр» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физического института им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Протвино, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, Россия

\*e-mail: balakin@ftcfian.ru

для космонавтов почти полностью основывается на экстраполяции данных, полученных от излучений с низкой ЛПЭ [6, 7].

Целью нашей работы являлось исследование влияния анестезии на радиочувствительность мышей по тесту 30-суточной выживаемости при тотальном облучении мышей пучками протонов и ионов углерода *in vivo* до и в пике Брэгга, а также рентгеновским излучением.

Эксперименты проводили в соответствии с международными требованиями на 2-месячных самцах мышей колонии SHK (30–35 г), которых содержали в стандартных условиях вивария [8], а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 26/2021 от 09.02.2021). В работе было использовано 405 мышей. Животные были разделены на две группы для облучения с анестезией и без. Каждую из групп делили на подгруппы ( $n = 10–15$ ) для облучения разными видами излучения и дозами. По отдельным экспериментальным точкам проведено 2–3 независимых эксперимента.

Животных облучали тотально в индивидуальных хорошо вентилируемых контейнерах. Мышей анестезировали за 10 мин до облучения комбинацией селективных препаратов ксилазина (Interchemie, Нидерланды) в дозировке 0.7 мг/кг и золетила 100 (Virbac, Франция) – 3.4 мг/кг. Препараты и дозы были подобраны на основе литературных данных о составе и механизмах действия соединений, а также биомедицинских результатах, полученных на мышах [9, 10]. Золетил 100 представляет собой смесь золазепам и тилетамина, обладающую противотревожным, седативным, вызывает миорелаксацию и полностью устраняет болевую чувствительность. Ксилазин – агонист центральных  $\alpha_2$ -адренорецепторов, оказывает седативное, анальгезирующее, анестезирующее, миорелаксирующее действие, а также обладает синергетическим эффектом в отношении золетила, что позволяет значительно уменьшить дозу препарата. Ксилазин характеризуется выраженным гипотензивным эффектом, что приводит к снижению частоты дыхания и гипоксии тканей [11], и может влиять на радиочувствительность мышей. Ранее нами при исследовании действия различных доз протонов и ионов углерода было показано отсутствие влияния данного наркоза на уровень цитогенетических повреждений в клетках костного мозга, состояние тимуса и селезенки, а также на поведение у необлученных и облученных мышей в короткие и отдаленные сроки после облучения [12, 13]. Глубину наркоза оценивали визуально по отсутствию некордированных движений у мыши и отрицательной реакции на болевой раздражитель в виде зажатия хвоста пинцетом. Выбранная схема ане-

стезии обеспечивала обездвиживание мышей во время укладки и облучения, а также 100% выход мышей из наркоза без введения дополнительных антагонистических препаратов и отсутствие гибели животных.

В качестве излучения с низким значением ЛПЭ применяли рентгеновское излучение (РИ). Мышей облучали РИ в диапазоне доз 6.0–8.5 Гр на установке РУТ (200 кВ, 1 Гр/мин, 2 кэВ/мкм) в Центре коллективного пользования “Источники излучения” (ИБК, Пушкино).

Облучение животных протонами проводили на комплексе протонной терапии ФТЦ ФИАН (Протвино) тонким сканирующим пучком с одного направления в импульсном режиме (длительность импульса 200 мс, 1 импульс в 2 с) и сигмой пучка – 2.8–3.6 мм в двух областях кривой Брэгга дозами 6.5–8.5 Гр. Верификацию положения мышей проводили лазерной системой позиционирования. При облучении до пика Брэгга протонами с энергией частиц 150 МэВ ЛПЭ, рассчитанная по программе планирования, составляла  $0.7 \pm 0.04$  кэВ/мкм, а в пике Брэгга энергия частиц на выходе из ускорителя составляла 91–123 МэВ при среднем значении ЛПЭ  $2.5 \pm 0.7$  кэВ/мкм. Контроль дозы проводили дозиметром РТW UNIDOS (Германия) и дозиметрической пленкой (ЕВТЗ, США) с погрешностью поглощенной дозы ~5%.

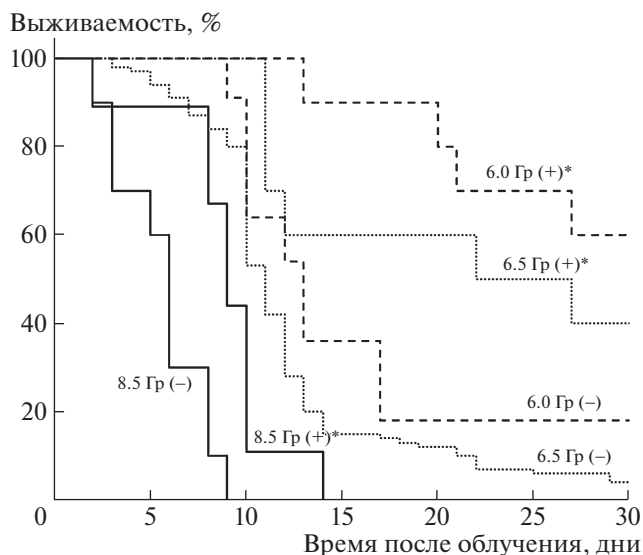
Облучение мышей моноэнергетическим пучком ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в дозе 6.5 Гр осуществлялось на установке “Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70” НИЦ “Курчатовский институт” – ИФВЭ (Протвино) в условиях, описанных ранее [14]. Расчетная величина ЛПЭ ионов углерода при позиционировании мышей до пика Брэгга равнялась 15 КэВ/мкм, а в модифицированном пике Брэгга – 39 КэВ/мкм. Дозиметрию проводили по показаниям монитора, ТЛД дозиметров типа ММТ. Профили пучка и равномерность поперечного облучения контролировали с помощью радиохромной пленки ЕВТ-3 (CafChromic, США).

После облучения в течение 30 сут ежедневно учитывали и взвешивали мышей. Влияние анестезии оценивали по динамике гибели, средней продолжительности жизни (СПЖ) погибших животных и изменению массы тела.

Показатели выживаемости мышей сравнивали с помощью непараметрических критериев: Гехана-Вилкоксона для оценки продолжительности жизни погибших от облучения животных и логрангового критерия для сравнения 30-суточной выживаемости. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ .

На рис. 1 представлены кривые выживаемости мышей, облученных сублетальными и летальными дозами РИ. Облучение мышей РИ в присут-





**Рис. 1.** Динамика гибели мышей, облученных РИ в диапазоне доз 6.5–8.5 Гр: (–) – без анестезии; (+) – с анестезией, \* $p \leq 0.01$  по сравнению с не анестезированными мышами.

ствии анестезии приводит к значительному повышению 30-суточной выживаемости ( $p \leq 0.01$ ) при всех дозах. СПЖ погибших мышей, облученных в дозе 6.0 Гр с анестезией, составила  $20 \pm 5$  сут, а без анестезии –  $13 \pm 3$  сут. СПЖ мышей, облученных в дозах 6.5 и 8.5 Гр, не зависела от наличия анестезии и в среднем равнялась  $13 \pm 5$  и  $6 \pm 3$  сут соответственно.

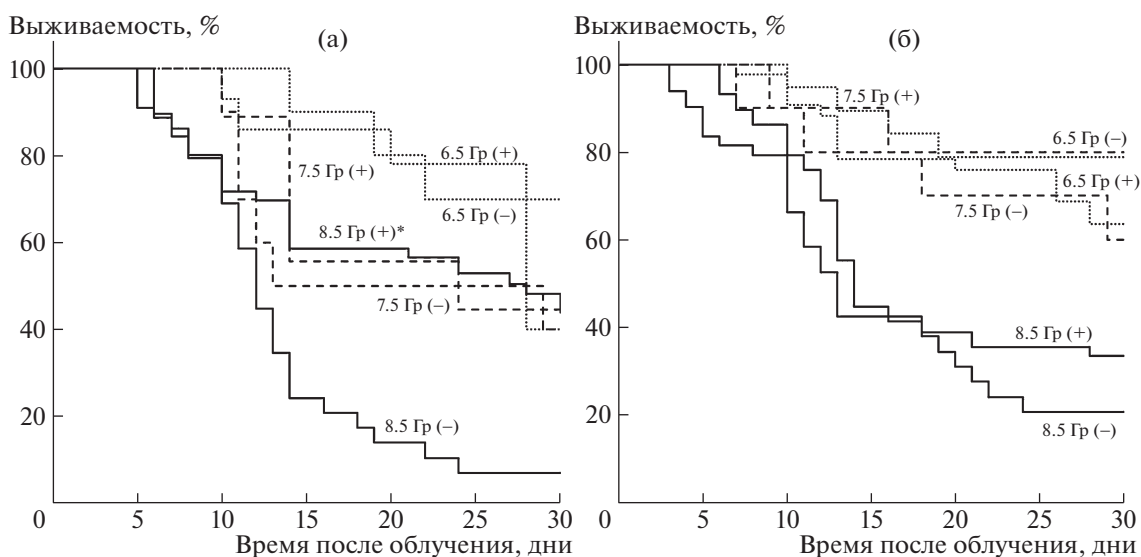
Во всех группах животных наблюдалось снижение массы тела. У мышей, облученных в дозе

6.0 Гр, снижение веса не зависело от применения анестезии, и максимальная 20% потеря массы тела наблюдалась на 13-е сутки после облучения. При облучении в дозе 6.5 Гр в первые сутки масса тела мышей снижалась одинаково на 5%. Максимальная потеря веса на 30%, характеризующая острую стадию лучевой болезни, при которой гибнут животные, в подгруппе без анестезии происходила на 9-е сутки, а в подгруппе анестезированных мышей только к 13-м суткам. При облучении в дозе 8.5 Гр снижение веса на 30% наблюдалось на 9-е сутки после облучения РИ и не зависело от наличия анестезии.

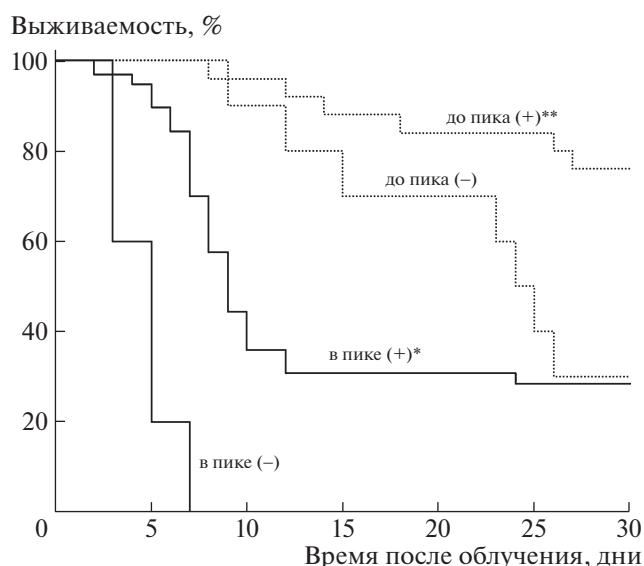
Как видно из данных на рис. 2а, анестезия не влияла на выживаемость мышей при облучении протонами в пике Брэгга в дозах 6.5 и 7.5 Гр. При облучении анестезированных мышей в дозе 8.5 Гр наблюдалось значительное повышение выживаемости: к 30-м суткам выжило 43% животных по сравнению с не анестезированными мышами, где этот показатель был всего 7%.

Во всех группах не зависимо от величины дозы и наличия анестезии наблюдалась максимальная потеря веса мышей до 25–30 % на 12–14-е сутки после облучения протонами. СПЖ погибших животных составила для групп 6.5 Гр –  $20 \pm 5$  сут; 7.5 Гр –  $13 \pm 4$  сут; 8.5 Гр –  $13 \pm 5$  сут.

Облучение мышей протонами в этом же диапазоне доз до пика Брэгга имитирует облучение тканей, находящихся до опухоли, и моделирует действие галактического излучения на организм. Это положение на кривой Брэгга характеризуется более низким значением ЛПЭ протонов по сравнению с облучением в пике Брэгга или РИ. Как видно из результатов на рис. 2б, анестезия не вли-



**Рис. 2.** Динамика гибели мышей, облученных протонами (а) в пике Брэгга и (б) до пика Брэгга в диапазоне доз 6.5–8.5 Гр: (–) – без анестезии; (+) – с анестезией, \* $p \leq 0.01$  по сравнению с не анестезированными мышами.



**Рис. 3.** Динамика гибели мышей, облученных ионами углерода до и в пике Брэгга в дозе 6.5 Гр: (–) – без анестезии; (+) – с анестезией, \* $p \leq 0.01$  по сравнению с не анестезированными мышами; \*\* $p \leq 0.05$  по сравнению с не анестезированными мышами.

яла на динамику гибели мышей, характер течения лучевой болезни и СПЖ погибших животных после облучения протонами до пика Брэгга.

Для количественного определения действия анестезии при облучении РИ и протонов мы рассчитывали фактор изменения дозы (ФИД) как отношение полулетальных доз ( $LD_{50/30}$ ) при введении модифицирующего вещества и без него. Для определения  $LD_{50/30}$ , при которой выживает 50% животных в течение месяца, использовали пробит-анализ в качестве метода преобразования кривых смертности. Для РИ ФИД = 1.13, что свидетельствует о слабом защитном эффекте анестезии в исследованном диапазоне доз. Для протонов в пике Брэгга ФИД = 0.94, а до пика ФИД = 0.95, т.е. не выявлено влияния анестезии на радиочувствительность мышей.

В отличие от протонов влияние анестезии на 30-суточную выживаемость мышей при облучении ионами углерода в дозе 6.5 Гр оказалось значимым, как в положении до пика, так и в пике Брэгга (рис. 3). После облучения мышей без анестезии в пике Брэгга к 7-м суткам наблюдалась 100%-ная гибель, а при использовании анестезии 30% животных доживало до 30 сут, основная гибель наблюдалась в течение 10 сут с потерей веса до 30%, а СПЖ погибших животных не отличалась. При облучении мышей ионами углерода до пика Брэгга 30-суточная выживаемость в экспериментальных группах резко различалась: без анестезии составляла 30%, а с анестезией – 76%. СПЖ погибших животных не отличалась и в

среднем составляла  $18 \pm 7$  сут. Максимальное снижение веса животных фиксировалось на 16-е сутки после облучения: в подгруппе с анестезией – на 15–20%, а в подгруппе без анестезии – на 25–30%.

Таким образом, как при облучении РИ, так и ускоренными ионами углерода, резко отличающимися значениями ЛПЭ и спецификой взаимодействия с живой материей, мы наблюдали одинаковое снижение потери массы тела в присутствии анестезии у животных, что указывает на реализацию защиты в наиболее критической первой стадии лучевой болезни. Возможно, защитное действие анестезирующих веществ происходит за счет расслабления гладкой мускулатуры и гипоксии в активно делящихся чувствительных клетках кишечного эпителия [9]. Это наблюдение является неожиданным, поскольку в многочисленных работах на клеточных и организменных моделях, в том числе и нами было показано, что ионы углерода обладают гораздо более повреждающим воздействием по сравнению с фотонными излучениями, и эффект слабо зависит от содержания кислорода в тканях [15, 16].

Влияние анестезии на радиационное поражение оценивали также по значениям площади под кривыми, отражающими динамику гибели мышей в течение 30 сут после воздействия излучений в зависимости от ЛПЭ (табл. 1).

Максимальный защитный эффект анестезии в 3.3 раза проявлялся при облучении мышей ионами углерода в пике Брэгга в дозе 6.5 Гр, а при облучении до пика в той же дозе влияние уменьшалось до 1.2. При облучении протонами в дозах 6.5 и 7.5 Гр как до, так и в пике Брэгга влияние анестезии на радиочувствительность мышей незначительно, но при облучении в пике Брэгга самой высокой дозой 8.5 Гр наблюдался защитный эффект: выживаемость возрастала в 1.7 раза. Значительное защитное действие анестезии по этому критерию показано и при действии РИ: в 1.7 раза для доз 6.0 и 8.5 Гр и в 2 раза для дозы 6.5 Гр. Полученные результаты показывают, что для объяснения наблюдаемых эффектов при использовании данной анестезии, обладающей гипоксическим действием, недостаточно классических представлений, согласно которым плотниоизирующее излучение в отличие от рентгеновского имеет слабую зависимость от кислородного эффекта. В литературе существуют указания на то, что уменьшение нарушений функций нервной системы с помощью седативных веществ, которые входят в исследованную нами комбинацию анестезии, помогают уменьшить негативные последствия облучения [17]. Отдельным важным вопросом, требующим дальнейшего изучения и обсуждения, является участие ингибирования или стимулирования различных клеточных рецепто-

**Таблица 1.** Результаты определения площади под кривыми выживаемости мышей после облучения в разных дозах излучениями с различной ЛПЭ

Вид излучения	ЛПЭ, кЭВ/мкм	Доза, Гр	Площадь под кривой, усл. ед.		Отношение показателей (I/II)
			без анестезии (I)	с анестезией (II)	
Рентгеновское	2.0	6.0	1551	2610	0.6:1
		6.5	1325	2410	0.5:1
		8.5	560	889	0.6:1
Протоны до пика Брэгга	0.7	6.5	2676	2606	1.0:1
		7.5	2500	2600	1.0:1
		8.5	1708	1704	1.0:1
Протоны в пике Брэгга	2.5	6.5	2650	2571	1.0:1
		7.5	2060	2176	0.9:1
		8.5	1354	2085	0.6:1
Ионы углерода до пика Брэгга	15	6.5	2240	2700	0.8:1
Ионы углерода в пике Брэгга	39	6.5	590	1447	0.4:1

ров в формировании системного ответа организма на облучение, поскольку известно, что используемая в нашей работе комбинация препаратов содержит соединения с хорошо изученным действием на NMDA-рецепторы и  $\alpha 2$ -адренорецепторы [18].

Таким образом, нами было показано, что применение ксилазин-золетиловой анестезии существенно снижает гибель животных при действии РИ и ионов углерода при облучении до и в пике Брэгга, при облучении протонами такого влияния не выявлено. Эти факты еще раз указывают на многообразие сигнальных путей клеточного и тканевого взаимодействия в отдаленной реализации начальных повреждений при действии ускоренных частиц с различными ЛПЭ при облучении *in vivo*. В связи с тем, что состав анестезии, использованный в нашей работе, применяется только для животных, полученные данные прежде всего имеют практическое значение при внедрении новых методов радиотерапии в ветеринарии, разработке адекватных моделей для биомедицины, доклинических испытаний новых источников излучения, а также исследования механизмов сочетанного действия фармакологических веществ и радиации с высокими значениями ЛПЭ.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам Лаборатории ионного лучевого комплекса НИЦ “Курчатовский институт” В.А. Пикалову и Группы ускорительной физики ФТЦ ФИАН А.Е. Шемякову за помощь в организации и проведении экспериментов на оборудовании “Радиобиологического стенда на углеродном пучке У-70” и комплекса протонной терапии ФТЦ ФИАН.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA), а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 26/2021 от 09.02.2021).

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по исследованию влияния анестезии на биологическую эффективность протонов и ускоренных ионов углерода на мышцах *in vivo* выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по темам, которые соответствуют ГЗ № 075-00381-21-00 (ИТЭБ РАН), а также договора НИР № 01/21 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li L.W., Chua G.W., Wenjun K., et al. Anaesthesia for radiotherapy in paediatric oncology—a retrospective observational study in an Asian population // Chin. Clin. Oncol. 2021. V. 10. № 3.
2. Гугушвили Б.С., Джанджгава И.М., Кахиани Э.Д., и др. Радиопротекторы (справочник). Тбилиси: Мецниерева; 1987.

3. *Vanderwaeren L., Dok R., Verstrepen K., et al.* Clinical progress in proton radiotherapy: biological unknowns // *Cancers (Basel)*. 2021. V. 13. № 4.
4. *Durante M., Debus J., Loeffler J.S.* Physics and biomedical challenges of cancer therapy with accelerated heavy ions // *Nat. Rev. Phys.* 2021. V. 3. № 12. P. 777–790.
5. *Yang R., Duan C., Yuan L., et al.* Inhibitors of HIF-1 $\alpha$  and CXCR4 mitigate the development of radiation necrosis in mouse brain // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2018. V. 100. № 4. P. 1016–1025.
6. *Cucinotta F.* (NASA Lyndon B. Johnson Space Center Houston, Texas), *Kim M.H., Chappell L.* (U.S.R.A., Division of Space Life Sciences Houston, Texas). Space radiation cancer risk projections and uncertainties – 2012. NASA Technical Publication; 2013 Report No.: TP-2013–0217375. Houston: NASA.
7. *Simpson J.A.* Elemental and isotopic composition of the galactic cosmic-rays // *Annu. Rev. Nucl. Particle. Sci.* 1983. V. 33. P. 323–381.
8. *Smith J., van den Broek F., Martorell J., et al.* Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // *Laboratory Animals*. 2007. V. 41. № 2. P. 143–160.
9. *Огнева Н.С., Савченко Е.С., Таболякова Л.А.* Анестезия самок мышей при хирургической трансплантации эмбрионов // *Биомедицина*. 2021. Т. 17. № 3Е. С. 64–69.
10. *Zhang Y.M., Yu D.X., Yin B.S., et al.* Xylazine regulates the release of glycine and aspartic acid in rat brain // *J. Vet. Res.* 2018. V. 62. № 1. P. 121–128.
11. *Старокожева Я.К., Климов П.В.* Оценка клинических эффектов агонистов альфа2-адренорецепторов-медетомидина и ксилазина в рандомизированном двойном слепом исследовании // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2017. № 4. С. 105–108.
12. *Balakin V.E., Rozanova O.M., Smirnova E.N., et al.* The effect of low and medium doses of proton pencil scanning beam on the blood-forming organs during total irradiation of mice // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 494. P. 231–234.
13. *Sorokina S.S., Zaichkina S.I., Rozanova O.M., et al.* The early delayed effect of accelerated carbon ions and protons on the cognitive functions of mice // *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2020. V. 47. P. 1651–1658.
14. *Заичкина С.И., Розанова О.М., Смирнова Е.Н. и др.* Оценка биологической эффективности ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в ускорительном комплексе У-70 по критерию выживаемости мышей // *Биофизика*. 2019. Т. 64, № 6. С. 1208–1215.
15. *Wang L., Frank S.J.* Principles of radiobiology. In: *Frank S.J., Zhu X.R.*, editors. *Proton Therapy Indications Techniques and Outcomes*. New York: Elsevier; 2020. P. 2–13.
16. *Tinganelli W., Durante M.* Carbon Ion Radiobiology // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 10.
17. *Свердлов А.Г.* Биологическое действие нейтронов и химическая защита. Л: Наука, 1974.
18. *Шарапов М.Г., Гудков С.В., Ланкин В.З. и др.* Роль глутатионпероксидаз и пероксиредоксинов при свободнорадикальных патологиях // *Биохимия*. 2021. Т. 86. № 11. С. 1635–1653.

## THE EFFECT OF XYLAZINE/ZOLETIL ANESTHESIA ON THE RADIOSENSITIVITY OF MICE UNDER TOTAL IRRADIATION WITH X-RAYS, PROTONS AND CARBON IONS

Corresponding Member of the RAS **V. E. Balakin<sup>a, #</sup>, O. M. Rozanova<sup>b</sup>, E. N. Smirnova<sup>b</sup>,  
T. A. Belyakova<sup>a</sup>, and N. S. Strelnikova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Branch “Physical-Technical Center” of P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences,  
Protvino, Russian Federation

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

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

The effect of xylazine-zoletil anesthesia on the radiosensitivity of mice irradiated with protons, carbon ions in two regions of the Bragg curve, and X-ray radiation was studied according to the criteria of 30-day survival, dynamics of death, and the average life span of dead mice. The maximum effect of anesthesia by 3.3 times was observed to reduce the death of animals during irradiation with carbon ions in the Bragg peak, with irradiation before the peak the effect was 1.2 times. In the case of proton irradiation at the Bragg peak, the protective effect of anesthesia by a factor of 1.7 was observed only at a dose of 8.5 Gy. Under mice were irradiated with X-ray in the dose range of 6.0–8.5 Gy, the anesthesia effect coefficient was 1.7–2. According to the 30-day survival method, it was shown that the use of a xylazine-zoletil mixture significantly changes the radiosensitivity of mice depending on the radiation dose and the quality of the radiation source.

**Keywords:** protons, carbon ion, Bragg curve, mice, survival, zoletil-xylazine anesthesia

УДК 632.656:581.1

## ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В КОРНЯХ ТОМАТОВ ПРИ ИНВАЗИИ ГАЛЛОВОЙ НЕМАТОДОЙ *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) CHITWOOD, 1949

© 2022 г. Ж. В. Удалова<sup>1</sup>, С. В. Зиновьева<sup>1,\*</sup>

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым

Поступило 24.04.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принято к публикации 02.06.2022 г.

Проведено исследование активности перекисного окисления липидов, каталазы, супероксиддисмутазы и пероксидазы в корнях растений томатов при экзогенной обработке нанокремнием в концентрации 1.0 мкг/мл при заражении *Meloidogyne incognita*. Показано, что в обработанных Si–НЧ растениях на ранних стадиях паразитирования наблюдается низкая активность ПО и СОД, а также и повышенный уровень ПОЛ, что указывает на образование свободных радикалов (АФК), способных ингибировать жизнедеятельность нематод, а также ограничить формирование гигантских клеток. Во время седентарной стадии, на этапах питания, развития и продуцирования яиц в корнях обработанных растений наблюдалась повышенная активность ПО, КАТ и СОД, а также низкая активность ПОЛ по сравнению с инвазированными необработанными растениями. Это позволяет поддерживать баланс между образованием и обезвреживанием АФК, и имеет значение не только в защите растительных тканей от окислительных процессов, но также и для сохранения гигантских клеток, питающих паразита. Представленные данные впервые показывают механизм действия Si–НЧ в развитии устойчивости и адаптации растений к биогенному стрессу, связанный с влиянием на различные компоненты антиоксидантной системы и их функциональным взаимодействием.

**Ключевые слова:** галловые нематоды, наночастицы кремния, индуцированная устойчивость, антиоксидантные ферменты, пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутазы, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31857/S2686738922050304

Проблема повышения устойчивости растений (иммунного статуса) к фитопатогенам путем индукции природных защитных механизмов разрабатывается уже многие годы. Это направление особенно актуально в защите растений от нематод – опасных паразитов корневой системы, ущерб от которых исчисляется миллионами долларов, а эффективные способы борьбы отсутствуют. Индуцированную устойчивость (ИУ) вызывают факторы биотической и абиотической природы, названные индукторами или элиситорами, способные активизировать сложную интегрированную систему защитных механизмов и тем самым максимально реализовать естественный иммунный потенциал растений. Среди множества

индукторов биогенной и абиогенной природы, способных влиять на иммунный статус растений, научный и практический интерес представляют микроэлементы, особенно в наноразмерных формах. В последнее время большое внимание стало уделяться исследованию наночастиц кремния (Si–НЧ), которые обладают низкой токсичностью, антибактериальными свойствами и пролонгированным действием [1, 2]. Благодаря уникальным физическим и химическим свойствам, Si–НЧ могут легко проникать в клетки растений и вызывать морфологические и физиологические изменения, способствующие повышению устойчивости к болезням, вызванным грибами, бактериями и нематодами [3–5]. Механизм действия Si–НЧ практически не исследован. Немногочисленные данные свидетельствуют о его воздействии на генерацию активных форм кислорода (АФК) – раннюю реакцию клеток на стрессоры различной природы [6, 7].

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: zinovievas@mail.ru

АФК в клетках растений образуются в обычных условиях и принимают участие в метаболизме. Нарушение про- и антиоксидантного равновесия ведет к их избыточному накоплению, усилению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), повреждению макромолекул и гибели клетки. Растения обладают эффективными механизмами для противодействия АФК. Антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), пероксидазы (ПО) и каталазы (КАТ) считаются основными ферментами, участвующими в удалении свободных радикалов и активных форм кислорода. Несмотря на то что интерес к изучению антиоксидантной системы защиты (АОС) уже многие годы не ослабевает, целый ряд особенностей ее функционирования, в частности, в условиях действия на растения биогенного стресса, вызванного паразитическими нематодами, остается до конца не выясненным. Имеющиеся в литературе данные об изменении окислительного гомеостаза, нарушенного нематодами, немногочисленны и достаточно противоречивы [8, 9]. Недостаточно полно изучена работа АОС у различных по нематодоустойчивости растений, хотя существует мнение, что устойчивые растения обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с восприимчивыми [8]. Отсутствуют данные о динамике изменений различных компонентов антиоксидантной ферментной системы (КАТ, СОД, ПО), а также об их функциональном взаимодействии на различных этапах развития паразитов, которые необходимы для установления роли АФК в развитии взаимоотношений в системе нематода–растения. В последние годы становится понятно, что компоненты этой системы пребывают в сложном функциональном взаимодействии друг с другом, которое может быть аддитивным, синергическим и антагонистическим [10].

Цель работы – исследовать влияние препарата Si–НЧ на процесс ПОЛ и антиоксидантной системы защиты клеток, в растениях томатов *Lycopersicon esculentum* Mill при инвазии их галловой нематодой *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949, на протяжении развития нематод в корнях растений и тем самым показать возможную роль про/антиоксидантной системы растений в системной устойчивости растений к нематодам, опосредованной Si–НЧ.

Исследования проводили на восприимчивом к галловой нематоды гибриде томатов F1 Гамаюн (ИУ 30%). Семена поверхностно стерилизованных томатов перед посадкой в грунт замачивали в 2 мл 1.0 мкг/мл препарата Si–НЧ течение 2 ч. Через 3 нед после прорастания часть растений инвазировали нематодой (3000 личинок/растение) и опрыскивали растворами препарата в тех же концентрациях, которыми обрабатывали семена (10 мл/растение). Контрольные семена и расте-

ния обрабатывали водой. Контролем были здоровые растения. Растительные пробы для анализов отбирали на ключевых этапах жизнедеятельности нематоды: 1-е сутки – внедрение в корни, межклеточная миграция; 3-и сутки – прекращение миграции, индукция и формирование мест питания – гигантских клеток (клеток сосудистой системы корня, метаболизм которых был направленно изменен секреторной деятельностью личинок); 5–7-е сутки – потеря подвижности, питание, развитие; 20-е сутки – питание, формирование яйцевого мешка, откладка яиц, завершение жизненного цикла. Анализы проводили в 3-кратной повторности.

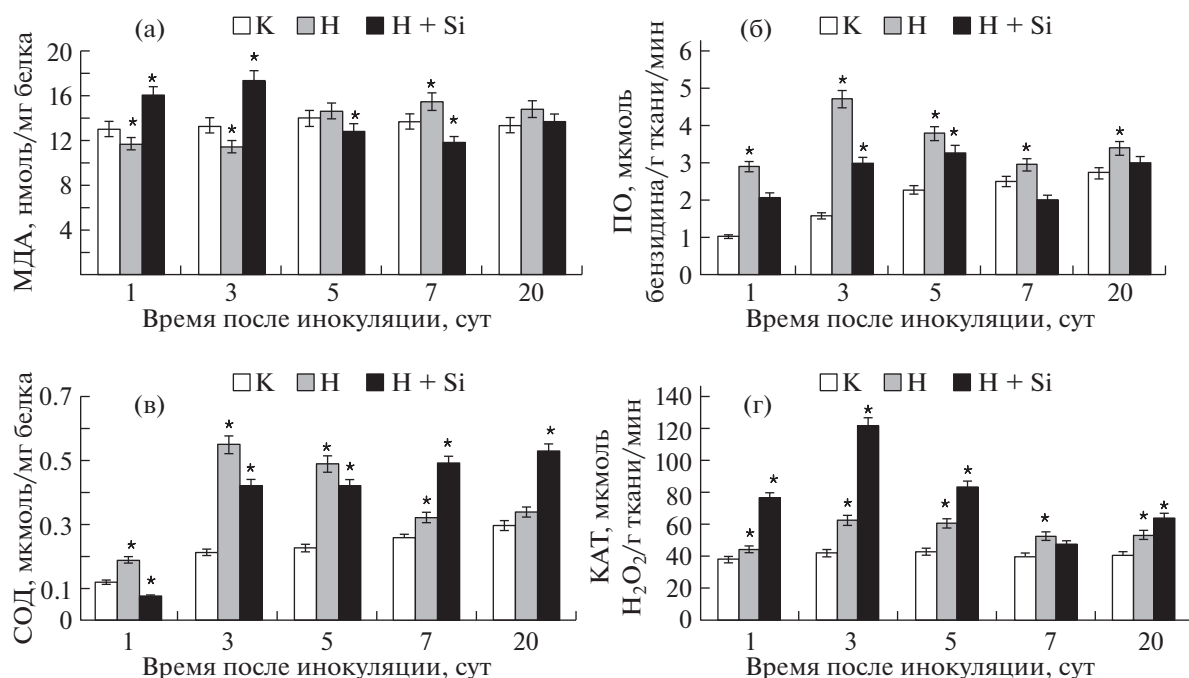
Для работы был использован препарат водного коллоидного раствора Si–НЧ, полученного методом лазерной абляции [11]. Средний размер частиц составлял  $65.3 \pm 1.6$  нм, рН раствора – 4.92, дзета-потенциал равен 12.3 мВ, исходная концентрация – 10 мкг/мл. Работу проводили с препаратом в концентрации 1.0 мкг/мл, поскольку в этой концентрации проявлялось наибольшее индуцирование устойчивости томатов к галловой нематоды, что было установлено нами ранее [5].

Об уровне оксидативного стресса судили по содержанию малондиальдегида (МДА) – конечного продукта перекисного окисления липидов, которое определяли по образованию окрашенных комплексов с 2-тиобарбитуровой кислотой. Общее содержание белка определяли по методу Бредфорда [12].

Активность ферментов измеряли спектрофотометрически [12]: активность СОД (СОД, КФ.1.15.1.1) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия; активность ПО (ПО, КФ.1.11.1.7) – реакцией окисления бензидина; активность КАТ (КАТ, КФ.1.11.1.6) – по количеству разложенной перекиси водорода. Данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. На рисунках приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

Полученные результаты показали, что в корнях томатов, которые не были обработаны Si–НЧ (контроль), в период межклеточной миграции и на этапе образования мест питания (1–3-и сутки после инвазии), активность ПОЛ была ниже, чем в здоровых растениях в пределах 20%. С переходом на седентарный образ жизни, в период активной жизнедеятельности и продуцирования яиц, содержание МДА было на уровне здоровых растений (рис. 1 а).

Активность ПО, СОД и КАТ в корнях контрольных растений (без обработки) на ранних стадиях паразитирования, связанных с проникновением и миграцией в корне, возрастала с максимумом на 3-и сутки (ПО в 2.9 раза, СОД в



**Рис. 1.** Активность антиоксидантных ферментов в корнях здоровых растений томатов (К); при заражении галловой нематодой (Н); обработанных препаратом нанокремния (Н+Si) при заражении галловой нематодой. а – активность перекисного окисления липидов (содержание малондиальдегида – МДА); б – активность пероксидазы (ПО); в – активность супероксиддисмутазы (СОД); Г – активность каталазы (КАТ). Данные по оси ординат – дни после инокуляции растений.  $M \pm m$ ;  $n = 3$ ; \* – статистически достоверное отличие от контроля ( $p \leq 0.05$ ).

2.6 раза, КАТ в 1.5 раза). Затем активность ферментов немного снизилась, но оставалась выше, чем в корнях здоровых растений (рис. 1 б, в, г).

Согласно нашим результатам, в корнях растений на протяжении всего периода развития нематод наблюдается повышенная активность антиоксидантных ферментов. Это позволяет поддерживать в активном состоянии защиту от окислительного стресса, о чем свидетельствует низкий уровень МДА – маркер оксидативного стресса. Таким образом, в восприимчивых растениях складываются благоприятные условия для формирования гигантских клеток, активного питания и успешного прохождения паразитом стадий жизненного цикла.

Обработка растений Si–НЧ вызвала изменение исследуемых показателей в корнях растений по сравнению с необработанными. Активность ПО и СОД корнях инвазированных растений, обработанных Si–НЧ, в первые 3 сут после инвазии (в период миграции и создания зоны питания – гигантских клеток) была значительно ниже (в 2–3 раза), чем в инвазированных без обработки (рис. 1 б, в). В этот же период уровень МДА в корнях был заметен выше (в 1.3–1.4 раза), чем в корнях необработанных растений (рис. 1 а). Низкая активность этих ферментов и повышенный уровень ПОЛ указывают на образование свободных радикалов (АФК), что может вызвать локальный

некроз в области внедрившихся личинок, ингибировать их жизнедеятельность, а также ограничить формирование гигантских клеток.

Как известно, количество свободных радикалов в клетке строго регулируется при участии КАТ как основного компонента антиоксидантной системы, которая, кроме этого, лимитирует продолжительность жизни АФК, предохраняя клетку от их вредоносного воздействия [13]. В первые три дня после инвазии активность КАТ была выше (в 1.7–1.8 раза), чем в корнях необработанных растений (рис. 1 г). Возможно, высокая активность КАТ на этапе, связанного с индукцией и образованием гигантских клеток, способствовала частичному обезвреживанию АФК, которые токсичны не только для патогена, но и для самого растения, и была направлена на сохранение функционирования клеток хозяина, нарушенного деятельностью АФК, образовавшихся в этот период.

Во время седентарной стадии, начиная с 5-х суток после инвазии, на этапах питания, развития и продуцирования яиц в корнях обработанных растений наблюдалась повышенная активность ПО, КАТ и СОД по сравнению с инвазированными необработанными растениями, а также низкая активность ПОЛ (рис. 1 а, б, в, г). Это позволяет поддерживать баланс между образованием и обезвреживанием АФК, и имеет значение не

только в защите растительных тканей от окислительных процессов, но также и для сохранения гигантских клеток, питающих паразита. Эти клетки, несмотря на возможное их ингибирование продуктами АФК на этапе их образования (низкий уровень активности СОД и ПО, повышенное содержание токсичных МДА), продолжают исполнять свою функцию, обеспечивая жизнедеятельность нематод и сохранность популяции в обработанных Si–НЧ растениях, хотя и в значительно меньших масштабах, как было показано нами ранее [5].

Следует отметить, что наблюдаемое изменение активности антиоксидантных ферментов на различных этапах жизненного цикла паразита может быть обусловлено не только реакцией растения-хозяина, но и вмешательством в этот процесс самих паразитов. Паразитические нематоды разработали сложную систему защиты от окислительного стресса, включающую антиоксидантные ферменты, выделяемые в апопласт растений, которые способны удалять из растения продукты АФК [14]. Показана высокая активность КАТ у мигрирующих личинок галловой нематоды; известно также, что галловые нематоды продуцируют и выделяют в апопласт по меньшей мере четыре эффектора, которые препятствуют образованию АФК. Недавно было сообщено о прямом взаимодействии лектина С-типа и КАТ, выделяемых личинками галловых нематод в апопласт, что указывает на возможную манипуляцию нематодой процессом образования АФК [15]. Возможно, обратимое изменение активности КАТ и других ферментов, наблюдаемое в корнях инвазированных растений, является результатом саморегуляции и адаптации партнеров, в зависимости от изменения условий существования, в том числе под воздействием Si–НЧ.

Полученные данные о действии Si–НЧ дополняют результаты ранее проведенных нами исследований. На системе томаты – галловая нематода *Meloidogyne incognita* было показано, что Si–НЧ стимулируют ростовые процессы растений, снижают зараженность корневой системы нематодами и оказывают ингибирующее влияние на морфо-физиологические показатели нематод. При этом было отмечено возрастание содержания фотосинтетических пигментов и ряда биогенных элементов в инвазированных растениях, свидетельствующих об улучшении их физиологического состояния [5].

Представленные результаты показали, что одним из механизмов действия нанокремния, позволяющего рассматривать его в качестве индуктора системной устойчивости томатов к галловой нематоды растений, является его влияние на активность компонентов АОС. Смещение прооксидантно-антиоксидантного равновесия, наблюда-

емое в растениях при действии Si–НЧ на ранних этапах паразитирования, может создать условия, неблагоприятные для жизнедеятельности нематод и их развития. Это подтверждается данными о нарушении репродуктивной функции нематод (снижение количества формируемых яиц и личинок с резко сниженной жизнеспособностью) при развитии на корнях обработанных растений, что в итоге приводит к снижению численности их популяции и является показателем устойчивости растений [5].

Безусловно, индуцирующее действие Si–НЧ основано на многих, еще неисследованных механизмах. Свойства Si–НЧ позволяют им непосредственно проникать в клетки растений и взаимодействовать с белками и другими биомолекулами. Такое прямое действие Si–НЧ может способствовать быстрой передаче клеточных сигналов и проявлять биологическую эффективность в отношении фитопатогенов (синтез низкомолекулярных соединений, обладающих биоцидными свойствами (фитоалексины, фенолы), активацию сигнальной системы растений и индукцию защитных белков). Исследование этих механизмов может открыть новые возможности как для регуляции устойчивости растений к стрессам, так и для предотвращения потерь при хранении урожая.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН д.т.н. Г.Э. Фолманису и к.т.н. М.А. Федотову за предоставленный для исследования препарат наноразмерного кремния.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kandhol N., Singh V.P., Peralta-Videa J., et al.* Silica nanoparticles: the rising star in plant disease protection // *Trends Plant Sci.* 2022. V. 27. № 1. P. 7–9.
2. *Zellner W., Tubana B., Rodrigues R.A., et al.* Silicon's role in plant stress reduction and why this element is not used routinely for managing plant health // *Plant Dis.* 2021. V. 105. № 8. P. 2033–2049.
3. *Rajput V.D., Minkina T., Feizi, et al.* Effects of silicon and silicon-based nanoparticles on rhizosphere microbiome, plant stress and growth // *Biology* 2021. V. 10. 791.
4. *Wang L., Ning C., Pan T., et al.* Role of silica nanoparticles in abiotic and biotic stress tolerance in plants: A review // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23. 1947.
5. *Udalova Zh.V., Folmanis G.E., Fedotov M.A., et al.* Effects of silicon nanoparticles on photosynthetic pigments and biogenic elements in tomato plants infected with root-knot nematode *Meloidogyne incognita* // *Dokl. Bioch. Bioph.* 2020. V. 495. P. 329–333.
6. *Khan M.R., Siddiqui Z.A.* Use of silicon dioxide nanoparticles for the management of *Meloidogyne in-*



- cognita*, *Pectobacterium betavascularum* and *Rhizoctonia solani* disease complex of beetroot (*Beta vulgaris*) // *Sci. Horticult.* 2020. V. 265. 109211.
7. El-Shetehy M., Moradi A., Maceroni M., et al. Silica nanoparticles enhance disease resistance in *Arabidopsis* plants // *Nat. Nanotechnol.* 2021. V. 16 № 3. P. 344–353.
  8. Melillo M.T., Leonetti P., Bongiovanni M., et al. Modulation of ROS activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato/root-knot nematode interactions // *New Phytol.* 2006. 170. P. 501–512.
  9. Leonetti P., Molinari S. Epigenetic and metabolic changes in root-knot nematode-plant interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. 7759.
  10. Колынаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. 2019. Киев: Логос, 2019. 277 с.
  11. Roldugin V.I., Fedotov M.A., Folmanis G.E., et al. Formation of aqueous colloidal solutions of selenium and silicon by laser ablation // *Dokl. Phys. Chem.* 2015. V. 463. № 1. P. 161–164.
  12. Кузнецов Вл.В., Кузнецов В.В., Романов Г.А. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М. БИНОМ. Лаборатория знаний. 2012. 487 с.
  13. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа. Гилем. 2001. 160 с. ISBN 5-75-01-0215-7.
  14. Jagdale S., Rao U., Giri A.P. Effectors of root-knot nematodes: an arsenal for successful parasitism // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. 800030.
  15. Zhao J., Sun Q., Quentin M., et al. A *Meloidogyne incognita* C-type lectin effector targets plant catalases to promote parasitism // *New Phytol.* 2021. V. 232. P. 2124–2137.

## EFFECTS OF SILICON NANOPARTICLES ON THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN TOMATO ROOTS INVASED BY MELOIDOGYNE INCOGNITA (KOFOID ET WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949

Zh. V. Udalova<sup>a</sup> and S. V. Zinovieva<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> A.N. Severtsov Institute of ecology and evolution of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS D.S. Pavlov

The effect of silicon nanoparticles (1 µg/mL) on the activity of lipid peroxidation, peroxidase, superoxide dismutase, and catalase in tomato roots invaded by root-knot nematode *Meloidogyne incognita* was studied. It was shown that in the early stages of parasitism treated with Si-NPs, low activity of PO and SOD, as well as an increased level of lipid peroxidation, are observed, which indicates the formation of free radicals (ROS) that can inhibit of nematodes and also limit the formation of giant cells. During the sedentary stage, at the stages of nutrition, development, and eggs production, the roots of treated plants showed an increased activity of PO, CAT, and SOD, as well as a low activity of POL compared to infested untreated plants. This makes it possible to maintain a balance between the formation and neutralization of ROS, and is important not only in the protection of plant tissues from oxidative processes, but also in the preservation of giant cells that feed the parasite. The presented data for the first time show the mechanism of action of Si-NPs in the development of resistance and adaptation of plants to biogenic stress, associated with the effect on various components of the antioxidant system and their functional interaction.

**Keywords:** root-knot nematodes, silicon nanoparticles, induced resistance, antioxidant enzymes, peroxidase, catalase, superoxide dismutase, lipid peroxidation

УДК 581.1

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ СЕМЕЙСТВА GLKs УЧАСТВУЮТ В ЦИТОКИНИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ПЛАСТИДНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *SCA3* В ХОДЕ ДЕЭТИОЛЯЦИИ *Arabidopsis thaliana*

© 2022 г. А. С. Дорошенко<sup>1,\*</sup>, А. М. Малюкова<sup>1,2</sup>, М. Н. Данилова<sup>1</sup>,  
член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов<sup>1</sup>, В. В. Кузнецов<sup>1</sup>

Поступило 05.04.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принято к публикации 01.06.2022 г.

Светозависимые транскрипционные факторы GLKs *Arabidopsis thaliana* принимают участие в антероградном контроле формирования хлоропластов в ходе деэтиоляции: регулируют экспрессию фотосинтетических генов ядерного кодирования, а также опосредуют транскрипцию пластидных генов. Наряду со светом биогенез хлоропластов определяется факторами эндогенной природы – фитогормонами, среди которых цитокинины значительно ускоряют формирование фотосинтетически активных пластид. В настоящей работе показано, что *транс*-факторы GLKs функционируют как цитокинин-зависимые регуляторы, опосредуя позитивное влияние цитокинина на экспрессию пластома через активацию транскрипции ядерного гена *SCA3*, кодирующего пластидную РНК-полимеразу RPOTr.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, деэтиоляция, цитокинины, транскрипционные факторы, экспрессия генов, биогенез хлоропластов

**DOI:** 10.31857/S2686738922050079

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на важнейшую роль хлоропластов в жизни растений, молекулярные механизмы их биогенеза остаются мало изученными. Формирование хлоропластов обычно происходит либо из пропластид в меристематических тканях, либо из этиопластов в процессе деэтиоляции растений.

Главным экзогенным фактором, определяющим биогенез фотосинтетически активных хлоропластов из этиопластов, является свет [1]. Свет разного качества воспринимается той или иной группой рецепторов, в большей степени, в цитоплазме, после чего сигнал поступает в ядро, что приводит к масштабному изменению экспрессии ядерных генов растительной клетки, многие из которых кодируют структурные и регуляторные белки хлоропластов. Контроль биогенеза фотосинтетически активных пластид белками ядерного кодирования называется антероградной регу-

ляцией, которая играет, вероятно, ведущую роль на всех этапах биогенеза хлоропластов.

Одним из наиболее ярких примеров антероградного контроля формирования хлоропластов является перепрограммирование экспрессии пластидных генов вследствие свето- и гормон-зависимого изменения активности аппарата транскрипции пластид в ходе деэтиоляции. В этиопластах транскрипцию, главным образом, осуществляют РНК-полимеразы типа NEP (Nuclear-Encoded RNA Polymerase) ядерного кодирования RPOTr и, в меньшей степени, RPOTrp, которые транскрибируют в значительной мере гены “домашнего хозяйства”. Вторая мультисубъединичная РНК-полимераза PEP (Plastid-Encoded RNA Polymerase) состоит из коровых субъединиц  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  и  $\beta''$  пластидного кодирования и проявляет слабую транскрипционную активность в нефотосинтезирующих пластидах. В ходе деэтиоляции PEP-полимераза претерпевает значительные структурные изменения за счет формирования комплекса с одним из сигма-факторов (SIG1-SIG6) и белками ядерного кодирования, ассоциированными с PEP (PAP1-PAP12), после чего PEP-полимераза инициирует транскрипцию фотосинтетических генов пластома [2]. Таким образом, ядерный геном контролирует транскрипци-

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: anastasiya04101993@gmail.com

онную активность пластидного генома путем координации транскрипции генов РНК-полимераз RPOTr и RPOTrp, сигма-факторов и PAP белков.

Ключевыми регуляторами экспрессии ядерного генома являются светозависимые факторы транскрипции. У *A. thaliana* были идентифицированы два *транс*-фактора GLK1 и GLK2 (Golden two-Like), инактивация которых приводит к нарушениям биогенеза хлоропластов [3] вследствие снижения транскрипции ядерных генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла, белки фотосинтетических комплексов и тилакоидных мембран [4].

Помимо света, программа деэтиоляции определяется факторами эндогенной природы – фитогормонами, среди которых цитокинины (ЦК) способны ускорять формирование хлоропластов [5]. Убедительно показано, что ЦК позитивно регулируют экспрессию генов ферментов биосинтеза хлорофилла и белков аппарата транскрипции пластома, стимулируют накопление фотосинтетических пигментов и ускоряют формирование ультраструктуры хлоропластов [6, 7]. В ряде тестов в действии света и ЦК наблюдается синергический эффект, что допускает возможность пересечения путей передачи сигнала света и цитокининов [6–8]. К настоящему времени показано, что одной из “точек пересечения” является светозависимый *транс*-фактор HY5, инактивация которого приводит к уменьшению позитивного действия ЦК в ходе деэтиоляции [8]. Однако отсутствие HY5 не исключает эффект ЦК, что позволяет предположить участие и других светозависимых *транс*-факторов, опосредующих действие ЦК в ходе деэтиоляции [9].

Как уже упоминалось, у *A. thaliana* инактивация генов двух *транс*-факторов GLK1 и GLK2 приводит к нарушению транскрипции как ядерных, так и пластидных фотосинтетических генов [3, 4]. Кроме того, Kobayashi и соавт. [10] показали, что белки GLKs участвуют в реализации позитивного эффекта ЦК на накопление хлорофилла в ходе деэтиоляции корней, а экспрессия гена *GLK2* активируется гормоном. Эти результаты наводят на мысль о возможном участии GLKs в регуляции экспрессии ядерных генов аппарата транскрипции пластид светом и ЦК. В данной работе мы впервые продемонстрировали вовлечение *транс*-факторов GLKs в цитокинин-зависимую регуляцию экспрессии ядерного гена *SCA3*, кодирующего пластидную РНК-полимеразу, что приводит к изменению экспрессии пластидных генов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили растения дикого типа *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia-0 и созданного на его основе нокаут-мутанта по генам *транс*-факторов *glk1glk2* (N9807, NASC, Великобритания). Наличие инсерции dSpm в генах *GLK1* и *GLK2* [3] доказано методом ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих вставку на ген *GKL1: Spm5* (F) 5'-ggatccgacactctttaattaactgacact-3'; (R) 5'-acttcttcacctttccccgaacta-3'; на ген *GLK2: Spm1* (F) 5'-cctatttcagtaagagtgtgggtttgg-3'; (R) 5'-aacaatctttacttttctccctttacg-3'. ПЦР-анализ с ДНК нокаут-мутанта *glk1glk2* подтвердил наличие вставок dSpm в генах *GLK1* и *GLK2*. Амплификация с ДНК из растений дикого типа показала отсутствие конструкций dSpm в растениях материнской линии *A. thaliana*. Таким образом, подтверждена гомозиготность нокаут-линий *glk1glk2 A. thaliana*, полученных из банка семян NASC.

Для изучения участия *транс*-факторов GLK1 (*AT2G20570*) и/или GLK2 (*AT5G44190*) в цитокинин-зависимой регуляции экспрессии гена *SCA3* в ходе деэтиоляции применяли экспериментальную постановку, разработанную Chory и соавт. [11]. Семена *A. thaliana* дикого типа и нокаут-мутанта *glk1glk2* стерилизовали раствором гипохлорита натрия и высевали на чашки Петри с питательной средой Мурасиге-Скуга, содержащей ½ питательных элементов (“Duchefa”, Нидерланды) без сахарозы и цитокинина или с добавлением *транс*-зеатина (1 мкМ). Семена стратифицировали в течение 4 дней при +4°C, после чего чашки Петри перенесли на +22°C в условия полной темноты. По истечении 4 сут с момента прорастания растения фиксировали в жидком азоте при слабом зеленом освещении ( $5 \pm 2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Оставшуюся часть проростков переносили на белый свет с интенсивностью  $120 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  в климатическую камеру MLR-352H-PE (Сапуо, Япония) и фиксировали в жидком азоте спустя 6 и 16 ч.

Относительный уровень транскриптов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени после обратной транскрипции (ПЦР-РВ) с использованием амплификатора LigthCyclerR96 (“Roche”, Швейцария). Количество транскриптов целевых генов нормировали относительно содержания мРНК референсного гена полиубиквитина *UBQ10* (*AT4G05320*). Для ПЦР-РВ анализа использовали следующие пары праймеров: *ARR5* – (F) ctactcgcagctaaaacgc; (R) gccgaaagaatcaggaca; *GLK1* – (F) tcggactaaaatggatggcttg; (R) ggtagaaggcggaggaagtgtttg; *GLK2* – (F) gccaaacasaagcctaactccg; (R) tgtggatagagtgttctctgatgc; *SCA3* – (F) ttgctgctgcttctattctgc; (R) gcacaatcaccaagccaact; *accD* – (F) gctaccaatcaatgtttacctc; (R) gattgataatcacaataaacgc; *clpP* – (F) cattccagatattaccatcca; (R) gc-caagaggttgataccgaa; *UBQ10* – (F) gcgtctctggtg-

gttctaa; (R) gaaagagataacaggaacggaaca. Образцы анализировали в трех биологических повторностях, каждая из которых включала по 3–4 аналитических повтора. Статистическая обработка проводилась согласно критерию Стьюдента (t-test) (\* $-p < 0.05$ , \*\* $-p < 0.01$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

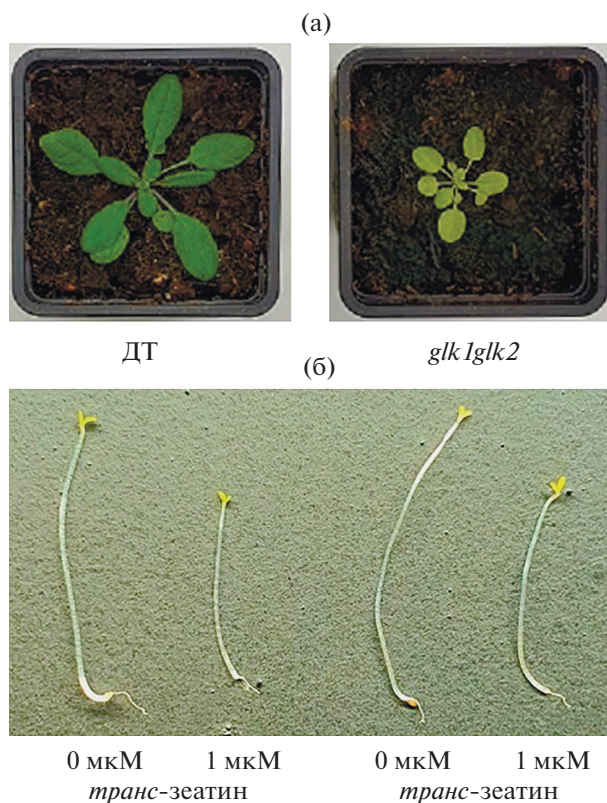
**Влияние цитокинина на морфологию проростков дикого типа и нокаут-мутанта *glk1glk2 A. thaliana*.** Семейство белков GLKs включает два транскрипционных фактора – GLK1 и GLK2, функции которых в значительной степени перекрываются. Нокаут-мутанты первого порядка имеют слабые фенотипические отличия от растений дикого типа, в то время как двойной мутант *glk1glk2*, который мы используем в данной работе, отличается от материнской линии меньшим размером розетки и пониженным содержанием хлорофилла (рис. 1а) [3].

Одним из характерных эффектов ЦК является укорочение гипокотыля проростка в темноте [11]. В условиях нашего эксперимента проростки дикого типа и двойного нокаут-мутанта *glk1glk2*, выращенные на питательной среде без ЦК, фенотипически не отличались (рис. 1б). Добавление в среду для выращивания *транс*-зеатина (1 мкМ) приводило к подавлению роста гипокотыля у растений дикого типа на 46% (без цитокинина  $12.6 \pm 1.5$  мм, с *транс*-зеатином –  $6.88 \pm 1.6$  мм). Растения нокаут-мутанта *glk1glk2* в присутствии ЦК имели длину гипокотыля на 38% короче, чем проростки, выращенные без гормона (без ЦК –  $12.9 \pm 1.4$  мм, с *транс*-зеатином –  $8.11 \pm 1.45$  мм). Этот результат подтверждает эффективность действия ЦК в условиях нашего эксперимента, а также указывает на чувствительность мутанта к экзогенному гормону.

**Мутации по генам *транс*-факторов GLKs (*glk1glk2*) не нарушают чувствительность растений к цитокину.** Для подтверждения чувствительности нокаут-мутанта *glk1glk2* к экзогенному ЦК мы изучили динамику содержания транскриптов гена семейства регуляторов ответа на цитокинин типа-А *ARR5*. Характерной особенностью данного семейства генов является их быстрая индукция в ответ на ЦК [12].

Результаты ПЦР в режиме реального времени показали увеличение уровня транскриптов гена *ARR5* в проростках дикого типа и нокаут-мутанта *glk1glk2* как в условиях темноты, так и в ходе цитокинин-зависимой деэтиоляции (рис. 2). При этом динамика содержания транскриптов исследуемого гена в проростках дикого типа и мутанта *glk1glk2* была сходной.

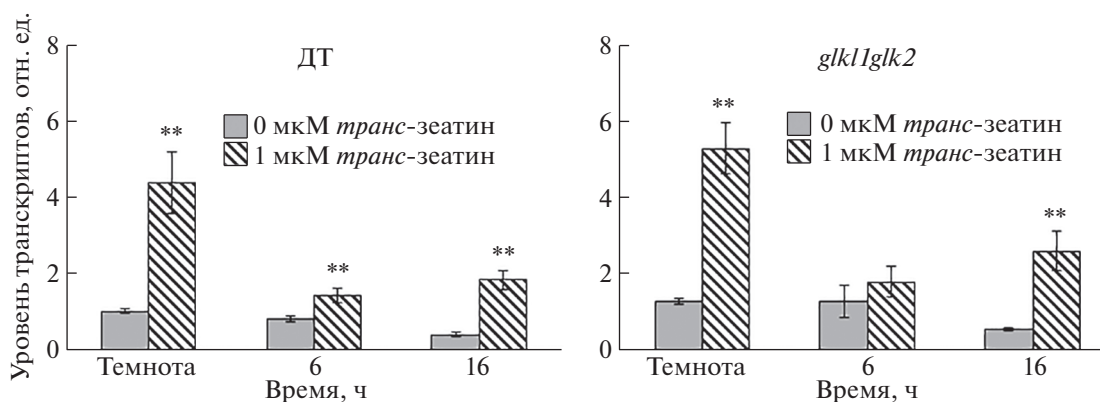
Эти результаты позволяют заключить, что мутации по генам *транс*-факторов GLKs не влияют



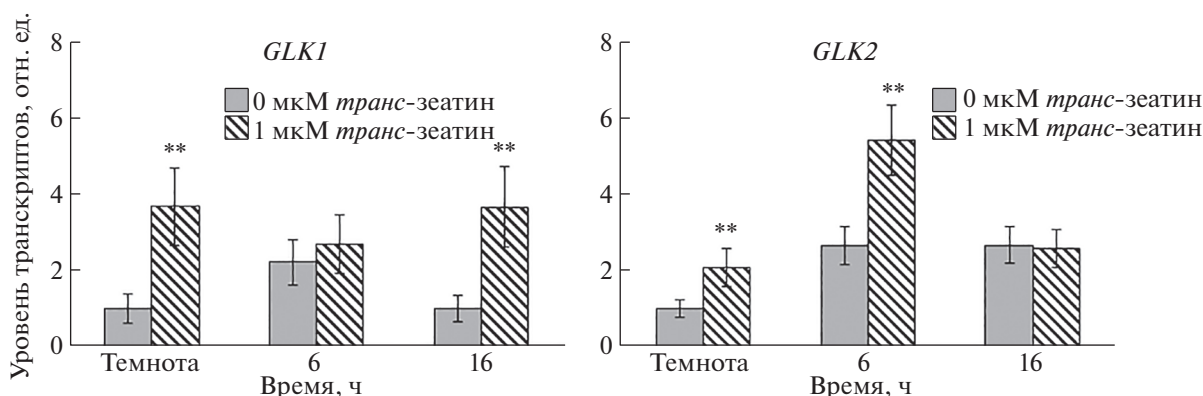
**Рис. 1.** Морфология растений дикого типа и нокаут-мутанта *glk1glk2 A. thaliana*. а – 3-недельные растения, слева – дикого типа (ДТ), справа – нокаут-мутанта *glk1glk2*; б – 4-дневные этиолированные проростки дикого типа и *glk1glk2*, выращенные на питательной среде без гормона (0 мкМ *транс*-зеатина) или в присутствии ЦК (1 мкМ *транс*-зеатин) спустя 16 ч освещения.

на восприятие и, возможно, передачу цитокининового сигнала и, что мутант *glk1glk2* чувствителен к экзогенному гормону подобно дикому типу.

**Цитокинин регулирует экспрессию генов *транс*-факторов *GLK1* и *GLK2* в ходе деэтиоляции.** Ранее Kobayashi и соавт. [10] в экспериментах по зелению корней *A. thaliana* продемонстрировали цитокинин-зависимую индукцию гена *GLK2*. Избирательность анализа экспрессии только *GLK2* была основана на тканеспецифичности экспрессии генов семейства *GLKs*: для *GLK1* характерна экспрессия только в фотосинтетических тканях, в корнях же уровень транскрипции *GLK1* ниже уровня детекции, а экспрессия *GLK2* характерна как для зеленых, так и для нефотосинтезирующих тканей (корней) [3]. Однако остается неизвестным, индуцирует ли ЦК экспрессию гена *GLK1* и сохраняется ли цитокинин-зависимая регуляция гена *GLK2* в ходе деэтиоляции проростков *A. thaliana*. Располагая данными о том, что оба гена семейства *GLKs* экспрессируются в семядольных листьях [3], мы предположили, что *GLKs* могут



**Рис. 2.** Влияние цитокинина на содержание транскриптов гена *ARR5* в проростках дикого типа и нокаут-мутанта *glk1glk2 A. thaliana* в темноте и в ходе деэтиоляции. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспрессии в проростках, выращенных на питательной среде без цитокинина vs. экспрессии в растениях, обработанных транс-зеатином при  $p \leq 0.01$ .



**Рис. 3.** Регуляция светом и цитокинином содержания транскриптов генов *GLK1* и *GLK2* в 4-дневных проростках дикого типа *A. thaliana* в ходе деэтиоляции. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспрессии в проростках, выращенных на питательной среде без цитокинина vs. экспрессии в растениях, обработанных транс-зеатином при  $p \leq 0.01$ .

являться участниками цитокинин-зависимого регуляторного каскада экспрессии генов в ходе деэтиоляции.

Анализ содержания транскриптов генов *GLK1* и *GLK2* в проростках дикого типа *A. thaliana* показал светозависимое накопление матриц исследуемых генов (рис. 3). Такая индукция содержания транскриптов генов *GLKs* согласуется с данными Fitter и соавт. [3].

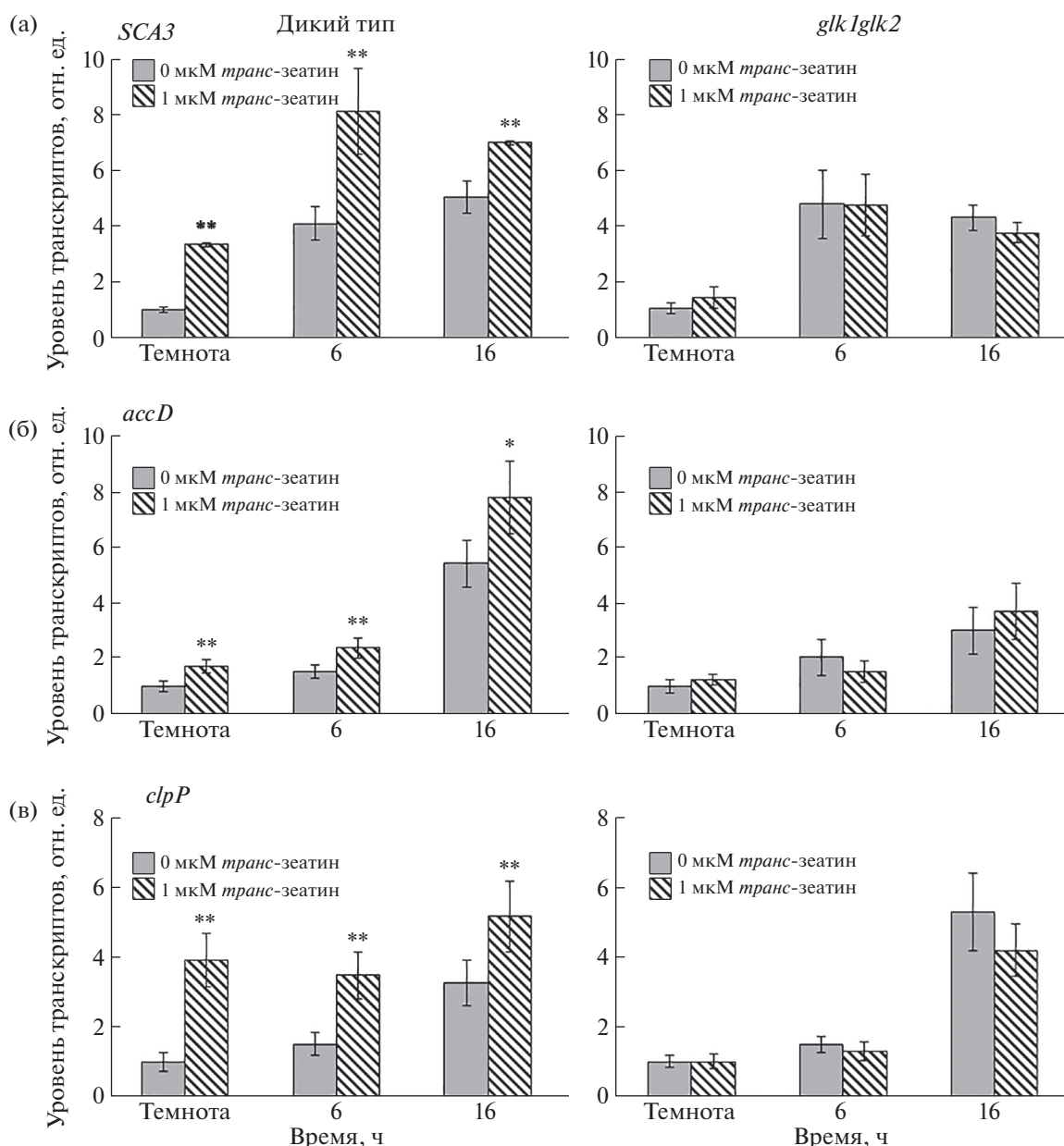
На фоне действия света ЦК увеличивал содержание транскриптов генов *GLK1* и *GLK2* как в условиях темноты, так и спустя 6 ч (*GLK2*) или 16 ч (*GLK1*) деэтиоляции (рис. 3). Этот результат позволяет предположить, что транс-факторы *GLK1* и *GLK2* могут принимать участие в цитокинин-зависимой регуляции экспрессии генов в ходе зеленения проростков *A. thaliana*.

**Транс-факторы GLKs регулируют цитокинин-зависимую экспрессию гена *SCA3*, кодирующего пластидную РНК-полимеразу *RPOTp*.**

Для того чтобы установить, участвуют ли белки семейства *GLKs* в регуляции экспрессии гена *SCA3* и *RPOTp*-зависимых пластидных генов, использовали двойной мутант *glk1glk2*.

Цитокинин-зависимая активация экспрессии генов транс-факторов *GLKs* позволила нам предположить участие данных факторов транскрипции в ЦК-зависимой активации экспрессии гена РНК-полимеразы *SCA3*. Ранее нами была продемонстрирована регуляция цитокинином уровня транскриптов гена *SCA3* в ходе зеленения *A. thaliana* [7], однако участники молекулярного каскада реализации данного позитивного эффекта до сих пор неизвестны.

Как показывают полученные результаты (рис. 4а), освещение этиолированных растений стимулировало увеличение уровня транскриптов гена *SCA3* как в проростках дикого типа, так и нокаут-мутанта *glk1glk2*, при этом отсутствие транс-факторов *GLKs* не изменяло ни профиль, ни уровень транскриптов в растениях *glk1glk2* (рис. 4а). В свою очередь, в отличие от дикого типа, обра-



**Рис. 4.** Влияние света и цитокинина на уровень транскриптов ядерного гена *SCA3*, кодирующего хлоропластную РНК-полимеразу RPOTr (А), а также RPOTr-зависимых пластидных генов *accD* (Б) и *clpP* (В) в 4-дневных проростках *A. thaliana* дикого типа и нокаут-мутанта *glk1glk2* в условиях темноты и в ходе деэтиоляции \* – достоверные различия между средними значениями экспрессии в проростках, выращенных на питательной среде без цитокинина vs. экспрессии в растениях, обработанных *транс*-зеатином при  $p \leq 0.05$ , \*\* при  $p \leq 0.01$ .

ботка *транс*-зеатином проростков *glk1glk2* не приводила к увеличению содержания матриц гена *SCA3*. Отсутствие реакции на ЦК указывает на возможное участие факторов транскрипции GLK1 и/или GLK2 в реализации позитивного эффекта ЦК на формирование хлоропласта в ходе деэтиоляции через активацию экспрессии гена РНК-полимеразы *SCA3*.

**Транс-факторы GLKs опосредуют активацию цитокинином экспрессии RPOTr – зависимых пластидных генов *accD* и *clpP* в ходе деэтиоляции**

*A. thaliana*. Дополнительным подтверждением участия *транс*-факторов GLKs в цитокинин-зависимой активации экспрессии гена *SCA3* явились результаты ПЦР-РВ по уровню транскриптов RPOTr – зависимых генов, а именно *accD* и *clpP* в ходе цитокинин-зависимой деэтиоляции мутанта *glk1glk2*. Оба гена относятся к генам “домашнего хозяйства”: *accD* кодирует β-субъединицу ацетил-СоА-карбоксилазы, участвующей в синтезе жирных кислот, *clpP* – каталитическую субъединицу протеазы Clp. Ген *accD* имеет только NEP-промотор, поэтому транскрипция этого ге-

на осуществляется NER-полимеразой. Промотор *clpP* содержит как NER, так и PER элементы, что позволяет транскрибировать этот ген как NER, так и PER-полимеразам, однако существуют данные о большем вкладе полимеразы NER в транскрипцию гена *clpP* [2].

Анализ показал, что освещение проростков как дикого типа, так и нокаут-мутанта приводит к увеличению содержания транскриптов генов *accD* и *clpP* (рис. 4 б, в). Значимые отличия между диким типом и *glk1glk2* наблюдались в динамике уровня мРНК генов *accD* и *clpP* в ответ на ЦК в ходе деэтиоляции: если в проростках материнской линии экзогенный ЦК увеличивал содержание транскриптов исследуемых генов во всех временных точках эксперимента, то инактивация генов факторов транскрипции GLKs у мутанта *glk1glk2* приводила к отсутствию цитокинин-зависимой регуляции (рис. 4 б, в).

Отсутствие позитивного эффекта ЦК на содержание транскриптов гена *SCA3* и двух RPOTr-зависимых генов *accD* и *clpP* у мутанта *glk1glk2* подтверждает участие *транс*-факторов GLK1 и/или GLK2 в реализации позитивного влияния ЦК на формирование хлоропласта путем контроля пластидной РНК-полимеразы ядерного кодирования.

Как известно, ЦК обладают широким спектром функциональной активности. Начальный путь передачи цитокинового сигнала включает цитоплазматические рецепторы AHKs (Arabidopsis Histidine Kinase), трансмиттеры AHPs (Arabidopsis Histidine phosphotransfer Proteins) и 11 *транс*-факторов ARR типа В (Arabidopsis Response Regulator) [13]. Несмотря на то что *транс*-факторы типа В имеют от 4 до 8 тысяч прямых сайтов связывания с промоторами ядерных генов [14], многочисленные транскриптомные исследования указывают на гораздо более обширный кластер цитокинин-регулируемых генов, что допускает вовлеченность в гормон-зависимую экспрессию *транс*-факторов более высокого порядка.

К их числу относятся три семейства *транс*-факторов GATA ядерной локализации: GNC (GATA Nitrate-inducible Carbon-metabolism-involved), GNL/CGA1 (GNC-Like/Cytokinin-responsive GATA factor 1) и GLKs (Golden two-Like) [2, 15]. Эти регуляторные белки опосредуют действие ЦК на хлоропласты, и, кроме того, экспрессия их генов позитивно регулируется ЦК [3, 16]. Помимо участия в ЦК-зависимой регуляции экспрессии ядерных генов, GNC и GLKs контролируют биогенез и деление хлоропластов, однако молекулярный механизм такого воздействия различается. Фактор GNC подавляет транскрипцию генов негативных регуляторов фотоморфогенеза *PIFs*, а также генов, кодирующих ферменты био-

синтеза и *транс*-факторов брассиностероидов, тем самым иницируя фотоморфогенез. Напротив, GLKs являются активаторами транскрипции генов, кодирующих белки светособирающих комплексов и ферменты биосинтеза хлорофилла. Полученные нами результаты впервые показали участие факторов транскрипции GLKs в цитокинин-зависимой активации экспрессии гена *SCA3*, что значительно углубляет понимание механизмов регуляции биогенеза хлоропластов *транс*-факторами GLKs.

Еще одним свето- и цитокинин-зависимым регулятором биогенеза хлоропластов является *транс*-фактор HY5. В исследованиях по зеленению корней *A. thaliana* Kobayashi и соавт. [10] показали взаимозависимость в действии факторов HY5 и GLKs. Это подтверждается тем, что экспрессия обоих генов подавляется ауксином и активируются ЦК, оверэкспрессия генов GLK1 и GLK2 приводит к увеличению уровня белка HY5 и белка светособирающего комплекса LHCP. Скрещивание мутанта *hy5-215* с растением оверэкспрессирующим *GLK1<sub>ox</sub>* или *GLK2<sub>ox</sub>* в некоторой степени компенсирует бледно-зеленый фенотип *hy5-215*, хотя не восстанавливает его полностью, из чего следует, что для функционирования *транс*-факторов GLKs необходим функционально-активный HY5. Кроме того, ранее мы показали [17], что цитокинин-зависимая экспрессия гена *SCA3* в ходе деэтиоляции опосредована *транс*-фактором HY5, а в данной работе показана зависимость экспрессии гена *RPOTr* от факторов GLKs. По-видимому, белки GLKs и HY5 являются элементами одного транскрипционного каскада регуляции экспрессии гена *SCA3*, кодирующей РНК-полимеразу RPOTr пластид, в ходе цитокинин-зависимой деэтиоляции.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 19-34-90183 и 20-04-00294), а также Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121040800153-1).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kusnetsov V.V., Doroshenko A.S., Kudryakova N.V., et al. Role of Phytohormones and light in de-etiolation. // Russian Journal of Plant Physiology. 2020. V. 67. P. 971–984.

2. Börner T., Aleynikova A., Zubo Y., et al. Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2015. V. 1847. P. 761–769.
3. Fitter D., Martin D., Copley M., et al. GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species // *Plant J*. 2002. V. 31. P. 713–727.
4. Zubo Y., Blakley I., Franco-Zorrilla J., et al. Coordination of chloroplast development through the action of the GNC and GLK transcription factor families // *Plant Physiol*. 2018. V. 178. P. 130–147.
5. Cortleven A., Schmölling Th. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin // *Journal of Experimental Botany*. 2015. V. 66. P. 4999–5013
6. Cortleven A., Marg I., Yamburenko M., et al. Cytokinin regulates the etioplast-chloroplast transition through the two-component signaling system and activation of chloroplast-related genes // *Plant Physiol*. 2016. V. 172. P. 464–478.
7. Danilova M., Doroshenko A., Kudryakova N., et al. Plastome Transcription Machinery and Peculiarities of the Expression of Its Genes during Cytokinin-Dependent Deetiolation of *Arabidopsis thaliana* // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018. V. 65. P. 801–812.
8. Vandenbussche F., Habricot Y., Condiff A., et al. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signaling pathways in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2007. V. 49. P. 428–441.
9. Doroshenko A., Danilova M., Medvedeva A., et al. Influence of blue-light signaling components on the regulation of cytokinin-dependent *Arabidopsis thaliana* seedlings' greening // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019. V. 66. P. 864–871.
10. Kobayashi K., Baba S., Obayashi T., et al. Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2012. V. 24. P. 1081–1095.
11. Chory J., Reinecke D., Sim S., et al. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 1994; 104: 339–347. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.339>
12. D'Agostino I., Deruère J., Kieber J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin // *Plant Physiol*. 2000. V. 124. P. 1706–17.
13. Kieber J.J., Schaller G.E. Cytokinin signaling in plant development // *Development*. 2018. V. 145. P. dev149344.
14. Xie M., Chen H., Huang L., et al. A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development // *Nature Communications*. 2018. V. 9 P. 1604.
15. Waters M.T., Wang P., Korkaric M., et al. GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis* // *The Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 1109–1128.
16. Chiang Y., Zubo Y., Tapken W., et al. Functional characterization of the GATA transcription factors GNC and CGA1 reveals their key role in chloroplast development, growth, and division in *Arabidopsis* // *Plant Physiol*. 2012. V. 160. P. 332–348.
17. Дорошенко А.С., Данилова М.Н. Участие компонентов сигналинга синего света в регуляции экспрессии генов аппарата транскрипции пластомы при цитокинин-зависимой деэтиляции *A. thaliana* // Сборник материалов Годичного собрания Общества физиологов растений России “Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды”, Иркутск, 10–15 июля 2018 г. – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2018. – Часть II. – стр. 908–912.

## TRANSCRIPTION FACTORS OF THE GLRS FAMILY ARE INVOLVED IN CYTOKININ-DEPENDENT REGULATION OF PLASTID RNA POLYMERASE *SCA3* GENE EXPRESSION DURING DEETIOLATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

A. S. Doroshenko<sup>a,#</sup>, A. M. Malyukova<sup>a,b</sup>, M. N. Danilova<sup>a</sup>,  
Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov<sup>a</sup>, and V. V. Kusnetsov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russian Federation

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

<sup>#</sup>e-mail: anastasiya04101993@gmail.com

Light-dependent transcription factors GLKs of *Arabidopsis thaliana* are involved in the anterograde regulation of chloroplast biogenesis during deetiolation: they regulate the expression of photosynthetic nuclear-encoded genes and also mediate the transcription of plastid genes. Chloroplast biogenesis is determined at the same time by light and by endogenous factors – the phytohormones, among which cytokinins significantly accelerate the formation of photosynthetically active chloroplasts. In the current work it was shown that GLKs trans-factors operate as cytokinin-dependent regulators, mediating the positive cytokinin effect on plastome expression through the activation of transcription of the *SCA3* nuclear gene encoding the plastid RNA polymerase RPO<sub>TP</sub>.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, deetiolation, cytokinins, transcription factors, gene expression, chloroplast biogenesis



УДК 577.346

## ГЕЛДАНАМИЦИН УСИЛИВАЕТ РАДИОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 В ОБЛУЧЕННЫХ ЗТЗ ФИБРОБЛАСТАХ

© 2022 г. Е. Г. Новосёлова<sup>1,\*</sup>, О. В. Глушкова<sup>1</sup>, М. Г. Шарапов<sup>1</sup>, М. О. Хренов<sup>1</sup>, С. Б. Парфенюк<sup>1</sup>, С. М. Лунин<sup>1</sup>, Т. В. Новосёлова<sup>1</sup>, Э. К. Мубаракшина<sup>1</sup>, Р. Н. Гончаров<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН Е. Е. Фесенко<sup>1</sup>

Поступило 05.05.2022 г.

После доработки 26.06.2022 г.

Принято к публикации 28.06.2022 г.

Целью исследования была оценка возможности повышения радиозащитного потенциала перокси-редоксина 6 (Prdx6) и его мутантной формы S32A путем их совместного использования с гелданамицином (GA) для фибробластов ЗТЗ, облученных рентгеновским излучением с дозой 6 Гр.

Мутантный фермент S32A, не обладающий фосфолипазной активностью, при его сочетанном применении с GA проявляет более выраженную радиозащитную активность. Использование такой комбинации противолучевых препаратов полностью снимает пик активности NF-κB в облученных ЗТЗ клетках. Другой фактор транскрипции, p53, являющийся показателем уровня апоптоза клетки и увеличивающийся при облучении, также снижается под действием S32A в сочетании с GA. Низкомолекулярный белок p21, являющийся маркером сенесценции клеток, продукция которого возрастает при облучении, также нормализуется при использовании S32A в сочетании с GA. Кроме того, использование этой комбинации радиозащитных препаратов заметно снижает стрессовый ответ клеток ЗТЗ на рентгеновское облучение.

*Ключевые слова:* рентгеновское излучение, фибробласты ЗТЗ, апоптоз, клеточный стресс, сенесценция, пероксиредоксин 6, гелданамицин

DOI: 10.31857/S2686738922050213

Известно, что в клетках, выживших после рентгеновского облучения, обычно наблюдаются изменения уровней экспрессии генов, связанных с репарацией ДНК, клеточным циклом, воспалением и иммунным ответом [1]. Ранее было установлено, что ионизирующая радиация (IR) является причиной клеточного стресса и нарушения активности клеток, вызываемой либо путем прямого повреждения ДНК, либо непрямого воздействия на ДНК через образование активных форм кислорода (ROS) [2]. По этой причине в течение многих лет проводятся исследования, направленные на поиск новых радиозащитных препаратов. Недавно мы показали, что фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6 (Prdx6) увеличивает выживаемость облученных ЗТЗ фибробластов, стимулирует их пролиферацию, подавляет апоптоз,

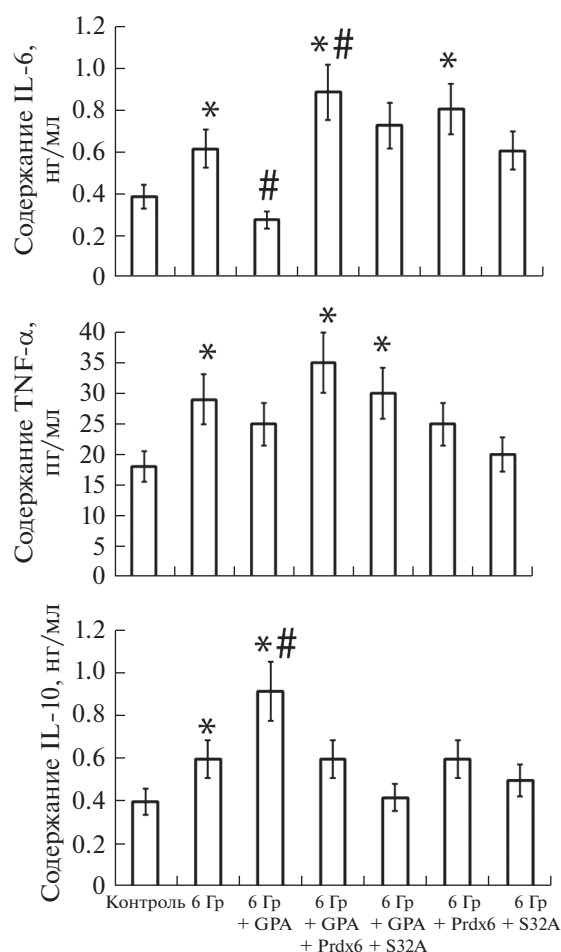
некроз и сенесценцию этих клеток, вызванных сублетальной дозой рентгеновского облучения [3]. На основании наших исследований был сделан вывод о целесообразности исследования разных форм пероксиредоксина 6 в качестве радиопротекторных агентов.

Целью настоящей работы было изучение возможности усиления радиозащитного действия белка Prdx6 и его мутантной формы S32A путем их использования совместно с известным блокатором белка теплового шока HSP90, гелданамицином (GA), обладающим радиозащитным и сенолитическим действием [4, 5].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали линию ЗТЗ фибробластов мыши из 5–10 пассажей и две формы пероксиредоксина 6: нормальный Prdx6, обладающий пероксидазной и фосфолипазной активностями, а также белок с мутацией (S32A) в фосфолипазном активном центре, обладающий только пероксидазной активностью. Мутагенез гена *PRDX6* проводили по методике перекрывающихся праймеров, с использованием высокоточной

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., Россия  
\*e-mail: elenapov\_06@mail.ru



**Рис. 1.** Продукция цитокинов в 3Т3 фибробластах после рентгеновского облучения в дозе 6 Гр и использования радиозащитных препаратов. Использовали первичные кроличьи антитела к IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-10 компании Rnprotech (USA). В качестве вторичных использовали козы антитела к Ig G кролика компании Имтек (Россия). Каждое значение – среднее от 3 независимых экспериментов с использованием в каждом случае клеток из разных пассажей. \* – достоверное отличие от контроля; # – достоверное отличие от группы 6 Гр.

ДНК полимеразы Tersus (Евроген, Россия), праймеров несущих точечную замену (S32A-F 5'-CTGGGAGACGCATGGGGCAT-3'; S32A-R 5'-ATGCCCATGCGTCTCCAG-3') и фланкирующих праймеров (Prx6-F 5'-TTTTTCATATGCCCCGAGGTCTGCTT-3'(NdeI), Prx6-R 5'-AATCTC-GAGAGGCTGGGGTGTGTA-3'(XhoI)). Условия ПЦР и этапы клонирования в вектор pET23b были подробно описаны ранее на примере другого мутанта Prdx6 [6]. Конструкцию, кодирующую мутантную форму Prdx6-S32A, проверяли секвенированием по Сэнгеру, с помощью компании Евроген.

Важно отметить, что Prdx6 и его мутантная форма S32A и ингибитор стрессового белка, GA,

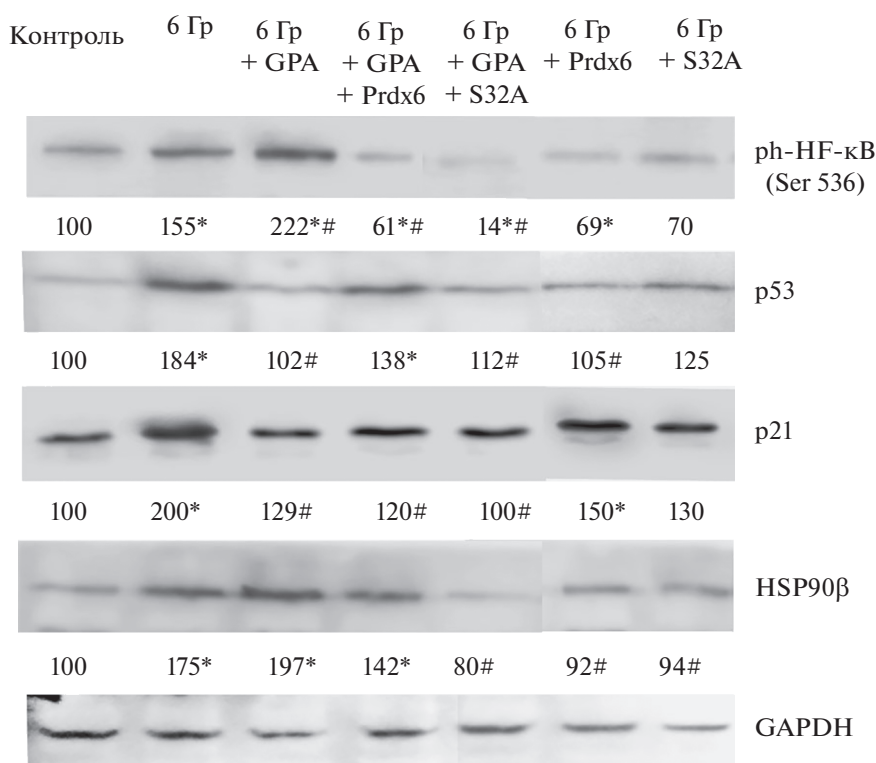
добавлялись к 3Т3 клеткам через 4 ч после рентгеновского облучения в дозе 6 Гр. После этих процедур клетки культивировали в течение 5 сут. Уровни цитокинов определяли с использованием иммуноферментного анализа, количество других белков оценивали, применяя вестерн блот анализ, как было описано ранее [3].

В работе проводили комплексное исследование клеточных ответов на радиационные повреждения, связанные с изменением неспецифического иммунитета, с процессами репарации, с апоптозом и старением (сенесценцией) клеток, с уровнем стрессового ответа 3Т3 фибробластов. Подобно другим стрессорам, ионизирующее излучение усиливало синтез различных иммуностимулирующих и модулирующих молекул, таких как белки теплового шока (HSP), цитокины, факторы транскрипции (p53, NF- $\kappa$ B), что было показано авторами с использованием облученных 3Т3 клеток [3].

В настоящей работе, оценивая эффекты облучения на показатели иммунного статуса 3Т3 клеток, мы показали, что рентгеновское облучение в дозе 6 Гр вызывает повышение продукции провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- $\alpha$  и противовоспалительного цитокина IL-10 (рис. 1).

Интересно, что добавление к клеткам ингибитора белка теплового шока HSP90 также снижало продукцию IL-6, но не IL-10. Результаты показали, что мутантный фермент-антиоксидант, не обладающий фосфолипазной активностью (S32A), в отношении продукции провоспалительных цитокинов проявляет наиболее выраженную радиозащитную активность, особенно при его сочетании с GA.

Для исследования механизмов влияния рекомбинантных белков на основе Prdx6 и ингибитора HSP90 на облученные 3Т3 клетки мы изучали ключевые звенья регуляции клеточных процессов. Среди этих звеньев ядерный фактор транскрипции каппа В (NF- $\kappa$ B) признан ключевым фактором регуляции активности клеточного метаболизма для большинства типов клеток, при этом NF- $\kappa$ B является центральным фактором транскрипции в иммунной системе и регулирует выживание клеток. Более того, индукция радиорезистентности опосредуется несколькими генами, которые регулируются NF- $\kappa$ B [7]. Было показано, что в облученных клетках уровень фосфорилирования NF- $\kappa$ B по Ser 536 достоверно увеличивается, а использование Prdx6 и его мутантной формы S32A в сочетании с GA полностью снимает пик активности NF- $\kappa$ B в облученных 3Т3 клетках, при этом более эффективной оказалась мутантная форма S32A (рис. 2). Выживаемость облученных 3Т3 клеток определяли с использованием Crystal Violet, как было описано ранее [3]. Показали, что добавление Prdx6 и осо-



**Рис. 2.** Продукция сигнальных и стрессовых белков в 3Т3 фибробластах после облучения в дозе 6 Гр и использования радиозащитных препаратов. Для определения всех белков использовали наборы компании CellSignalling (USA). Показаны фотографии Вестерн блот анализа для одного из 3 независимых экспериментов, цифры под полосками – среднее значение количества белка после денситометрии блотов от трех экспериментов, показатели нормировали к соответствующему контролю нагрузки (GAPDH) и выражали в относительных единицах. Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента. \*Достоверное отличие от контроля; # – достоверное отличие от группы 6 Гр.

бенно его мутантной формы S32A увеличивает процент выживших клеток, при этом защита белками-антиоксидантами не возрастает в присутствии GA (табл. 1).

Известно, что p53 играет важную роль в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптоза [8]. По этой причине оценивали в 3Т3 клетках продукцию белка p53, причем измеряя и фосфорилированные формы этого белка p53 (S46) и p53 (S15), которые имеют различные функции в клетке. Ранее мы показали, что ионизирующая радиация в дозе 6 Гр достоверно увеличивает уровень p53 в клетке, а также увеличивает уровень фосфорилирования p53 (S46) и p53 (S15) [3]. На этом фоне добавление после облучения двух форм пероксидазы к клеткам в сочетании

с GA показывает очевидный защитный эффект, нормализуя уровень p53, а также способствуя выживанию клеток (рис. 2).

Одним из важных регуляторов клеточной активности является низкомолекулярный белок p21, продукт гена *CDKN1A*, впервые идентифицированный как циклонезависимый регулятор киназы (CDK) и играющий важную роль в контроле развития клеточного цикла. Белок p21 останавливает клеточный цикл во время G1 и S-фазы через связывание и ингибирование циклин-CDK1,2,4,6 комплексов [9]. Кроме того, оценка уровня p21 является важным показателем в качестве маркера сенесценции клеток.

Результаты показали, что рентгеновское облучение в сублетальной дозе увеличивает продук-

**Таблица 1.** Жизнеспособность клеток Balb/3Т3, в % от контроля  $\pm$ SE

	контроль	6 Гр	6 Гр + GA	6 Гр + GA + Prdx6	6 Гр + GA + S32A	6 Гр + Prdx6	6 Гр + S32A
Жизнеспособность клеток	100 $\pm$ 8.2	61.8 $\pm$ 7.2*	84.7 $\pm$ 9.1#	70 $\pm$ 6.9	72 $\pm$ 7.1	88 $\pm$ 8.8#	92 $\pm$ 9.4#

\* – достоверное отличие от контроля, # – достоверное отличие от группы 6 Гр.

цию p21 в клетках, а GA, в сочетании с Prdx6 и, особенно, с его мутантной формой S32A полностью нормализует пролиферацию и снижает уровень сенесценции облученных 3T3 фибробластов (рис. 2). Кроме того, когда-то считалось, что белок p21 действует как опухолевый супрессор, главным образом, ограничивая клеточный цикл, что приводит к подавлению опухолевого роста. При углубленных исследованиях роли этого белка было обнаружено, что p21 регулирует радиационные ответы клеток за счет участия во множестве клеточных процессов, включая остановку клеточного цикла, апоптоз, репарацию ДНК, старение и аутофагию [10]. Действительно, мы показали, что рентгеновское облучение в дозе 6 Гр значительно повышает продукцию p21, а присутствие GA в среде культивирования облученных фибробластов нормализует пролиферацию 3T3 клеток в присутствии Prdx6, при этом более эффективным оказалось использование белка-антисенесценции S32A (рис. 2).

Известно, что прямыми показателями клеточного стресса являются активация продукции белков теплового шока HSP90 $\alpha$  и HSP90 $\beta$ , уровень продукции которых влияет на радиочувствительность клеток [11]. Мы обнаружили, что облучение 3T3 фибробластов приводит к достоверному увеличению конститутивной формы белка теплового шока HSP90, HSP90 $\beta$ . При этом присутствие Prdx6 в среде культивирования клеток в сочетании с GA заметно снижает стрессовый ответ клеток 3T3 на рентгеновское облучение. Важно отметить, что и в этом случае более эффективным было использование мутантной формы S32A в сочетании с GA (рис. 2). Следует отметить, что приведенные результаты не противоречат тому факту, что защитное действие Prdx6 в отношении фибробластов, подвергнутых воздействию ДНК-повреждающих агентов, было обнаружено почти 20 лет назад [12].

Важность разработки новых противолучевых средств связана не только с защитой при инцидентах радиоактивного загрязнения, но и при использовании лучевой терапии [13]. В настоящее время лучевая терапия является одним из основных методов лечения рака, при этом, несмотря на многие преимущества этого лечения, такие как неинвазивность, сохранение целостности органов и точность при нацеливании на опухоль, оно может привести к осложнениям в облученных здоровых тканях. По этой причине использование радиозащитных средств может в значительной степени снизить вероятность радиационно-индуцированных осложнений.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФФИ, проект № 20-015-00216.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McKelvey K.J., Hudson A.L., Back M., et al.* Radiation, inflammation and the immune response in cancer // *Mammalian Genome*. 2018. V. 29. P. 843–865.
2. *Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L.* Oxidatively generated base damage to cellular DNA // *Free Radical Biology and Medicine*. 2010. V. 49. P. 9–21.
3. *Novoselova E.G., Sharapov M.G., Lunin S.M., et al.* Peroxiredoxin 6 applied after exposure attenuates damaging effects of X-ray radiation in 3T3 mouse fibroblasts // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 12. P. 1951.
4. *Li L., Wang L., You Q.D., et al.* Heat shock protein 90 inhibitors: An update on achievements, challenges, and future directions // *J. Med. Chem.* 2020. V. 12. № 63 (5). P. 1798–1822.
5. *Stankova K., Savova G., Nikolov V., et al.* HSP90 inhibitor geldanamycin as a radiation response modifier in human blood cells // *Dose-response*. 2015. V. 13. № 1. eCollection Jan-Mar 2015.
6. *Sharapov M.G., Novoselov V.I., Fesenko E.E., et al.* The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress: effects on gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals // *Free radical research*. 2017. V. 51. № 2. P. 148–166.
7. *Bai M., Ma X., Li X., et al.* The accomplices of NF- $\kappa$ B lead to radioresistance // *Review Curr. Protein. Pep.t Sci.* 2015. V. 16. № 4. P. 279–294.
8. *Pei D., Zhang Y., Zheng J.* Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx // *Oncotarget*. 2012. V. 3. P. 228–235.
9. *Georgakilas A.G., Martin O.A., Bonner W.M.* p21: a two-faced genome guardian trends // *Mol. Med.* 2017. V. 23. P. 310–319.
10. *Kuang Y., Kang J., Li H., et al.* Multiple functions of p21 in cancer radiotherapy // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2021. V. 147. P. 987–1006.
11. *Schilling D., Kühnel A., Konrad S., et al.* Sensitizing tumor cells to radiation by targeting the heat shock response // *Cancer Lett.* 2015. V. 1. № 360 (2). P. 294–301.
12. *Dierick J.-F., Wenders F., Chainiaux F., et al.* Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. // *Biogerontology*. 2003. V. 4. № 3. P. 125–131.
13. *Sheikholeslami S., Khodaverdian S., Dorri-Givb M., et al.* The radioprotective effects of alpha-lipoic acid on radiotherapy-induced toxicities: A systematic review // *International Immunopharmacology*. 2021. V. 96. P. 107741.

## GELDANAMYCIN ENHANCES THE RADIOPROTECTIVE EFFECT OF PEROXYREDOXIN 6 IN IRRADIATED 3T3 FIBROBLASTS

E. G. Novoselova<sup>a,#</sup>, O. V. Glushkova<sup>a</sup>, M. G. Sharapov<sup>a</sup>, M. O. Khrenov<sup>a</sup>, S. B. Parfenyuk<sup>a</sup>, S. M. Lunin<sup>a</sup>, T. V. Novoselova<sup>a</sup>, A. K. Mubarakshina<sup>a</sup>, R. G. Goncharov<sup>a</sup>, and E. E. Fesenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: elenanov\_06@mail.ru*

The aim of the study was to evaluate the possibility of increasing the radioprotective potential of peroxiredoxin 6 (Prdx6) and its mutant form S32A by their combined use with geldanamycin (GA) for 3T3 fibroblasts irradiated with X-rays at a dose of 6 Gy.

The mutant enzyme S32A, which does not have phospholipase activity, when combined with GA, exhibits a more pronounced radioprotective activity. The use of this combination of anti-radiation drugs completely abolishes the peak of NF- $\kappa$ B activity in irradiated 3T3 cells. Another transcription factor, p53, which is an indicator of the level of cell apoptosis and increases upon irradiation, is also reduced by S32A in combination with GA. The low molecular weight protein p21, which is a marker of cell senescence and whose production increases upon irradiation, is also normalized when S32A is used in combination with GA. In addition, the use of this combination of radioprotective drugs significantly reduces the stress response of 3T3 cells to X-ray irradiation.

*Keywords:* X-ray radiation, 3T3 fibroblasts, apoptosis, cellular stress, senescence, peroxiredoxin 6, geldanamycin

УДК 577.2+577.29+578.233.3+616-092.4

## ИНДУКЦИЯ ГИПОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА В КЛЕТКАХ CACO-2 ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ЭНДОЦИТОЗ И ТРАНСЦИТОЗ SARS-COV-2

© 2022 г. С. А. Нерсисян<sup>1,2,\*</sup>

Представлено академиком РАН А.Г. Габитовым

Поступило 08.06.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принято к публикации 28.06.2022 г.

В настоящей работе оценивали влияние гипоксического ответа в клетках Caco-2 на экспрессию генов и микроРНК, вовлеченных в механизмы внутриклеточного транспорта вирусных частиц SARS-CoV-2, а именно, эндоцитоз и трансцитоз. С помощью секвенирования РНК показано, что при имитации гипоксии путем воздействия на клетки производного оксихинолина двукратно увеличивается экспрессия канонического рецептора *ACE2* для вируса SARS-CoV-2, а также экспрессия неканонического рецептора *TFRC*. Значимый рост экспрессии наблюдался для генов из семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL), играющих ключевую роль в трансцитозе: *LDLR*, *LRP1*, *LRP4* и *LRP5*. Повышение уровней экспрессии *LDLR* сопровождалось понижением экспрессии микроРНК *hsa-miR-148a-3p*, способной напрямую связываться с мРНК *LDLR*. Таким образом, в ходе гипоксического ответа в клетках Caco-2 повышается экспрессия генов, вовлеченных в механизмы эндоцитоза и трансцитоза вирусных частиц SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** Caco-2, кишечник, гипоксия, оксихинолин, SARS-CoV-2, ACE2, LDL, транскриптом, микроРНК

**DOI:** 10.31857/S2686738922050201

Список сокращений: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени. GO – gene ontology. FDR – false discovery rate, уровень ложноположительных результатов. FPKM – fragments per kilobase of transcript per million mapped. HIF – hypoxia-inducible factor, индуцируемый гипоксией фактор. KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. RPM – reads per million mapped reads.

Активная репликация вируса SARS-CoV-2 в кишечнике может являться причиной возникновения симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта у пациентов с COVID-19 [1]. Известно, что в кишечнике значительной доли переболевших COVID-19 сохраняется вирусная РНК в промежутке от недели до нескольких месяцев. Более того, длительное присутствие вирусной РНК коррелирует с нарушениями пищеварения,

что может являться одним из факторов постковидного синдрома [2, 3]. Гипоксия является одним из основных индукторов патологий кишечника, включая воспаление и колоректальный рак [4]. Роль гипоксии во взаимодействиях SARS-CoV-2 и клеток кишечника на сегодняшний день не установлена.

Главными “входными воротами” в клетку для вирусной частицы SARS-CoV-2 является рецептор ACE2, экспрессирующийся на поверхности эпителиальных клеток многих органов, включая легкие и кишечник [5]. Дальнейшая судьба вируса может включать в себя трансцитоз, позволяющий вирусу пересекать кишечный барьер, что может иметь важное клиническое значение. Ранее было установлено, что одной из наиболее подходящих клеточных моделей для изучения эндоцитоза и трансцитоза вирусных частиц SARS-CoV-2 являются клеточные линии Caco-2, экспрессирующие все необходимые факторы [6].

МикроРНК – класс коротких некодирующих РНК, осуществляющих негативную регуляцию экспрессии генов. Связывание seed региона микроРНК (нуклеотиды 2–7 с 5'-конца молекулы) с 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО) мРНК-мишени приводит к деградации мРНК или к

<sup>1</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

\*e-mail: snersisyan@hse.ru

**Таблица 1.** Используемые для ПЦР-РВ праймеры и их эффективность

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Эффективность
<i>ACE2</i>	AGAGAAGTGGAGGTGGATGGTCTTT	GCGGGGTCACAGTATGTTTCATCA	2.10
<i>TFRC</i>	GTCCAGACAATCTCCAGAGCTGC	TCTGTTTTCCAGTCAGAGGGACAGT	1.97
<i>LDLR</i>	CATTGTCCTCCCATCGTGCTC	AGCTGTAGCCGTCCTGGTTG	2.06
<i>LRP1</i>	GGCGTCACTTGCTTGCGCAA	TGAATCGGTCCGAGGGGACAG	2.08
<i>LRP4</i>	GGGAGTGTGAGGAGGACGAGT	TGGCACTGCTGAGGGACAGTTC	1.98
<i>LRP5</i>	TGCGATGACCAGAGCGACGA	GCAGGCAGATGGCGTCACAG	1.97
<i>ACTB</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA	2.03

остановке трансляции [7, 8]. Нами ранее было показано, что семейство микроРНК miR-200 подавляет экспрессию ACE2 [9]. Поиск регуляторных механизмов для других генов, вовлеченных во взаимодействия SARS-CoV-2 и клеток, представляет большой интерес.

В настоящей работе с помощью секвенирования нового поколения был проанализирован профиль экспрессии генов и микроРНК дифференцированных клеток Caco-2 под воздействием производного оксихинолина, являющейся ингибитором HIF-пролилгидроксилазы и имитирующей гипоксию путем стабилизации HIF1A – главного транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией [10].

Эксперименты проводили аналогично исследованию [11]. Вкратце, клетки Caco-2 получали из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) и инкубировали 21 день в условиях для дифференцировки. Воздействие на клетки производили с помощью производного оксихинолина 4896–3212 (Исследовательский Институт Химического Разнообразия, Химки, Россия): 7-((4-(трет-бутил)фенил)((4-метилпиридин-2-ил)амино)метил)хинолин-8-ол (см. детали в [12]), концентрация – 5 мкМ. После 24-часовой инкубации клетки лизировали для дальнейшего анализа. В каждой группе (воздействие и контроль) использовали по три биологических повтора. РНК выделяли с помощью Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия). Подготовка библиотек для секвенирования мРНК и микроРНК проводили с помощью наборов Illumina Stranded mRNA Library Prep Kit и NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit for Illumina (Illumina, Сан-Диего, США) соответственно. Использовали секвенатор Illumina NextSeq 550.

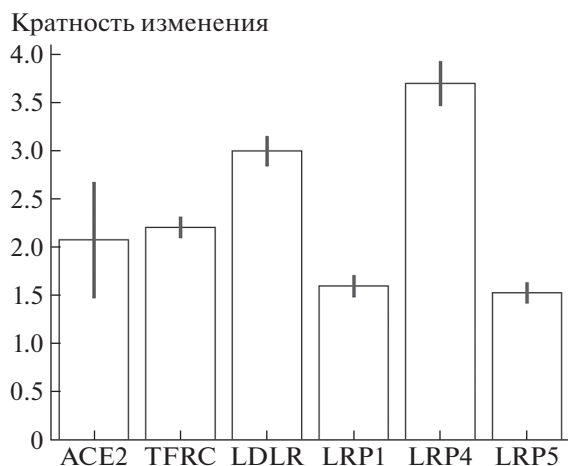
Качество исходных FASTQ файлов секвенирования оценивали с помощью FastQC версии 0.11.9 (Babraham Bioinformatics, Кембридж, Англия), адаптеры прочтений обрезали с помощью cutadapt версии 2.10. Ненормированные таблицы экспрессий мРНК и микроРНК получали путем картирования прочтений секвенирования с по-

мощью STAR версии 2.7.5b и miRDeep2 версии 2.0.1.2 соответственно. Полученные таблицы нормировали и фильтровали с использованием edgeR версии 3.30.3, получая на выходе логарифмированные по основанию 2 шкалы fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM) и reads per million mapped reads (RPM) для мРНК и микроРНК секвенирований соответственно. Анализ дифференциальной экспрессии мРНК и микроРНК проводили с помощью DESeq2 версии 1.28.1. Значимыми считали изменения экспрессии с кратностью изменения не менее 1.5 и False Discovery Rate (FDR) <0.05 (для расчетов FDR использовали процедуру Бенджамини-Хохберга).

Валидацию изменений экспрессии ключевых мРНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией аналогично исследованию [13]. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1. Анализ дифференциальной экспрессии по данным ПЦР-РВ проводили с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$  и *t*-критерия Стьюдента, в качестве референсного гена использовали *ACTB*.

Гены, вовлеченные в процессы эндоцитоза и транцитоза, выделяли из базы данных Gene Ontology (GO). Анализ обогащения по функциональной принадлежности проводили с помощью веб-сервиса DAVID версии 2021 г., используя базу данных биологических путей Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Мишени микроРНК предсказывали с помощью веб-портала miRDB версии 6.0.

В результате сравнения профилей экспрессии мРНК между образцами с индуцированной гипоксией и контрольными клетками было найдено 6309 дифференциально экспрессированных генов. Анализ обогащения дифференциально экспрессированных генов по функциональной принадлежности выявил отчетливую активацию сигнального пути HIF1A (KEGG hsa04066, FDR <0.05) и анаэробного гликолиза (KEGG hsa00010, FDR <0.05), что является свидетельством индукции гипоксического ответа при обработке клеток



**Рис. 1.** Кратность изменения экспрессии генов *ACE2*, *TFRC*, *LDLR*, *LRP1*, *LRP4*, *LRP5* при гипоксическом ответе в клетках Сасо-2. Высота вертикальных отрезков обозначает стандартное отклонение, рассчитанное по трем экспериментальным и трем контрольным образцам с помощью DESeq2 (FDR <0.05 для всех генов).

Сасо-2 оксигинолином. Тот же анализ не выявил активацию путей, связанных с возможной токсичностью воздействия на клетки (в частности, апоптоз и репарация ДНК). Наблюдалось двукратное увеличение экспрессии гена *ACE2* (FDR <0.05), кодирующего основной рецептор для вируса SARS-CoV-2 (рис. 1). Помимо канонического рецептора было отмечено двукратное увеличение экспрессии мРНК рецептора трансферрина I *TFRC*, также способного к связыванию S-белка SARS-CoV-2 с последующим эндоцитозом вирусной частицы [14].

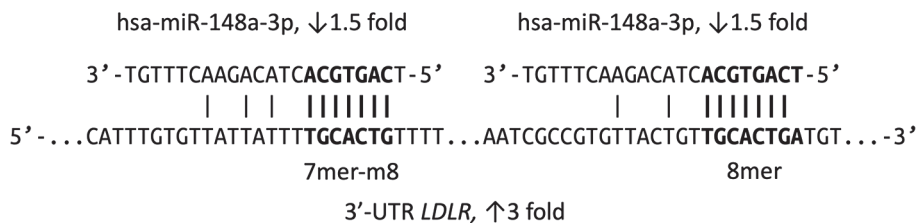
При анализе дифференциально экспрессированных генов, кодирующих белки, вовлеченные в эндоцитоз и трансцитоз, было отмечено статистически значимое повышение уровня экспрессии генов семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL), включая *LDLR* (кратность изменения 3.0), *LRP1* (кратность изменения 1.6), *LRP4* (кратность изменения 3.7), *LRP5* (кратность изменения 1.5), см. рис. 1. Одной из хорошо изученных функций данных рецепторов

является трансцитоз LDL через различные барьеры [15, 16]. Ранее было показано, что повышенная экспрессия рецептора LDLR является фактором тяжелого течения у пациентов с COVID-19 [17, 18]. Изменение экспрессии генов *ACE2*, *TFRC*, *LDLR*, *LRP1*, *LRP4*, *LRP5* было подтверждено с помощью ПЦР-РВ: статистически значимый рост уровней экспрессии ( $p < 0.05$ ) наблюдался для всех генов, кратности изменения экспрессии, согласно ПЦР-РВ, были в 1–1.7 раза выше, чем по данным секвенирования РНК.

Для поиска возможных причин изменения экспрессии генов при гипоксическом ответе был проведен анализ дифференциально экспрессированных микроРНК, уровни экспрессии которых оценивали с помощью секвенирования. Двумя высокоэкспрессированными микроРНК со значимым (FDR <0.05) различием экспрессии в обработанных оксигинолином и контрольных клетках были hsa-miR-210-3p и hsa-miR-148a-3p. Экспрессия hsa-miR-210-3p возросла в 1.7 раза при воздействии оксигинолином, что является еще одним свидетельством успешной индукции гипоксического ответа – повышенная экспрессия hsa-miR-210-3p является общепринятым маркером клеточного ответа на гипоксию [19].

Следующая микроРНК, hsa-miR-148a-3p, являлась четвертой по абсолютному уровню экспрессии среди всех микроРНК контрольных клеток Сасо-2, занимая 7% от всех прочтений секвенирования. Снижение уровня экспрессии микроРНК hsa-miR-148a-3p в полтора раза при воздействии оксигинолином являлось возможной причиной роста экспрессии гена *LDLR*. А именно, 3'-нетранслируемая область мРНК *LDLR* содержала два сайта связывания seed регионов микроРНК hsa-miR-148a-3p типов 7mer-m8 (комплементарность нуклеотидов 2–8 с 5'-конца микроРНК) и 8mer (7mer-m8, а также напротив 1-го нуклеотида с 5'-конца микроРНК расположен аденин), см. рис. 2. Взаимодействие hsa-miR-148a-3p и *LDLR* было ранее подтверждено с помощью люциферазных репортерных конструкций [20].

Таким образом, было показано, что при моделировании гипоксии производного оксигиноли-



**Рис. 2.** Сайты связывания hsa-miR-148a-3p в 3'-нетранслируемой области мРНК *LDLR*. Жирным шрифтом выделены расширенные seed регионы микроРНК и соответствующие им участки мРНК-мишени.



на в клетках Caco-2 повышается экспрессия генов *ACE2* и *TFRC*, кодирующих рецепторы, способные к связыванию с S-белком вируса SARS-CoV-2, а также повышение уровня экспрессии генов семейства рецепторов LDL, вовлеченных в механизмы эндоцитоза и трансцитоза. Одной из причин роста экспрессии гена *LDLR* могло служить снижение уровня экспрессии микроРНК hsa-miR-148a-3p, способной напрямую связываться с мРНК *LDLR*. Следовательно, гипоксия кишечника может являться неблагоприятным фактором при COVID-19.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60399.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Qian Q., Fan L., Liu W., Li J., Yue J., Wang M., Ke X., Yin Y., Chen Q., Jiang C. Direct Evidence of Active SARS-CoV-2 Replication in the Intestine. // *Clinical Infectious Diseases*. 2021. V. 73. P. 361–366.
2. Natarajan A., Zlitni S., Brooks E.F., Vance S.E., Dahlen A., Hedlin H., Park R.M., Han A., Schmidtke D.T., Verma R., Jacobson K.B., Parsonnet J., H.F. Bonilla, Singh U., Pinsky B.A., Andrews J.R., Jagannathan P., Bhatt A.S. Gastrointestinal symptoms and fecal shedding of SARS-CoV-2 RNA suggest prolonged gastrointestinal infection. // *Med (New York, N.Y.)* 2022.
3. Zollner A., Koch R., Jukic A., Pfister A., Meyer M., Rössler A., Kimpel J., Adolph T.E., Tilg H., Postacute COVID-19 is Characterized by Gut Viral Antigen Persistence in Inflammatory Bowel Diseases. // *Gastroenterology*. (2022).
4. Singhal R., Shah Y.M., Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. // *The Journal of Biological Chemistry*. 2020. V. 295. P. 10493–10505.
5. Sungnak W., Huang N., Bécavin C., Berg M., Queen R., Litvinukova M., Talavera-López C., Maatz H., Reichart D., Sampaziotis F., Worlock K.B., Yoshida M., Barnes J.L. HCA Lung Biological Network, SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. P. 681–687.
6. Knyazev E., Nersisyan S., Tonevitsky A. Endocytosis and Transcytosis of SARS-CoV-2 Across the Intestinal Epithelium and Other Tissue Barriers. // *Frontiers in Immunology*. 2021. V. 12. P. 636966.
7. Nersisyan S., Shkurnikov M., Poloznikov A., Turchinovich A., Burwinkel B., Anisimov N., Tonevitsky A. A Post-Processing Algorithm for miRNA Microarray Data. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21.
8. Turchinovich A., Tonevitsky A.G., Cho W.C., Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015. V. 2. P. 11.
9. Nersisyan S., Shkurnikov M., Turchinovich A., Knyazev E., Tonevitsky A. Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. // *PloS One*. 2020. V. 15. P. e0235987.
10. Poloznikov A.A., Nersisyan S.A., Hushpulian D.M., Kazakov E.H., Tonevitsky A.G., Kazakov S.V., Vechorko V.I., Nikulin S.V., Makarova J.A., Gazaryan I.G. HIF Prolyl Hydroxylase Inhibitors for COVID-19 Treatment: Pros and Cons. // *Frontiers in Pharmacology*. 2020. V. 11. P. 621054.
11. Nersisyan S., Galatenko A., Chekova M., Tonevitsky A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. // *Frontiers in Genetics*. 2021. V. 12. P. 662468.
12. Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Gazaryan I., Ivanchenko M., Khristichenko A., Poloznikov A., Hushpulian D., Nikulin S., Tonevitsky E., Abuзарова G., Mitroshina E., Vedunova M. Neuroprotective Effect of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibition in an In Vitro Hypoxia Model. // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020. V. 9. P. 662.
13. Maltseva D., Raygorodskaya M., Knyazev E., Zgoda V., Tikhonova O., Zaidi S., Nikulin S., Baranova A., Turchinovich A., Rodin S., Tonevitsky A. Knockdown of the  $\alpha 5$  laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. // *Biochimie*. 2020. V. 174. P. 107–116.
14. Tang X., Yang M., Duan Z., Liao Z., Liu L., Cheng R., Fang M., Wang G., Liu H., Xu J., Kamau P.M., Zhang Z., Yang L., Zhao X., Peng X., Lai R. Transferrin receptor is another receptor for SARS-CoV-2 entry. // *BioRxiv*. 2020.10.23.350348.
15. Dehouck B., Fenart L., Dehouck M.P., Pierce A., Torpier G., Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. // *The Journal of Cell Biology*. 1997. V. 138. P. 877–889.
16. Zhang X., Sessa W.C., Fernández-Hernando C. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2018. V. 5. P. 130.
17. Vlasov I., Panteleeva A., Usenko T., Nikolaev M., Izumchenko A., Gavrilova E., Shlyk I., Miroshnikova V., Shadrina M., Polushin Y., Pchelina S., Slonimsky P. Transcriptomic Profiles Reveal Downregulation of Low-Density Lipoprotein Particle Receptor Pathway Activity in Patients Surviving Severe COVID-19. // *Cells*. 2021. V. 10.
18. Cure E., Cumhur M. Cure. Strong relationship between cholesterol, low-density lipoprotein receptor, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, and SARS-COV-2: this association may be the cause of death in the patient with COVID-19. // *Lipids in Health and Disease*. 2021. V. 20. P. 179.
19. Huang X., Le Q.-T., Giaccia A.J. MiR-210—micromanager of the hypoxia pathway. // *Trends in Molecular Medicine*. 2010. V. 16. 230–237.
20. Goedeke L., Rotllan N., Canfrán-Duque A., Aranda J.F., Ramírez C.M., Araldi E., Lin C.-S., Anderson N.N., Wagschal A., de Cabo R., Horton, J.D. Lasunción M.A., Näär A.M., Suárez Y., Fernández-Hernando C. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. // *Nature Medicine*. 2015. V. 21. P. 1280–1289.

## INDUCTION OF HYPOXIC RESPONSE IN Caco-2 CELLS PROMOTE THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN SARS-CoV-2 ENDOCYTOSIS AND TRANSCYTOSIS

S. A. Nersisyan<sup>a,b,#</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Molecular Biology (IMB), the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

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

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

In the present manuscript we analyzed the influence of hypoxic response in Caco-2 cells on the expression of genes and miRNAs involved in the mechanisms of intracellular transport of SARS-CoV-2 viral particles, especially endocytosis and transcytosis. With the use of RNA sequencing of Caco-2 cells treated by hypoxia-inducing oxyquinoline derivative, we showed two-fold increase in the expression of the main SARS-CoV-2 receptor ACE2. Expression of the non-canonical receptor TFRC was also elevated. We also observed a significant increase in the expression levels of genes from the low-density lipoprotein (LDL) receptor family, which play a crucial role in the transcytosis: *LDLR*, *LRP1*, *LRP4* u *LRP5*. Upregulation of *LDLR* was coupled with the downregulation of hsa-miR-148a-3p, which can directly bind to *LDLR* mRNA. Thus, the hypoxic response in Caco-2 cells includes upregulation of genes involved in the mechanisms of endocytosis and transcytosis of SARS-CoV-2 viral particles.

**Keywords:** Caco-2, intestine, hypoxia, oxyquinoline, SARS-CoV-2, ACE2, LDL, transcriptome, miRNA

УДК 575.22:595.773.4

## ПРИВЛЕЧЕНИЕ НА ХРОМАТИН (GA)<sub>n</sub>-АССОЦИИРОВАННЫХ ФАКТОРОВ GAF И Psq В ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЗАВИСИТ ОТ ПРИСУТСТВИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ

© 2022 г. Д. А. Четверина<sup>1</sup>, Ф. В. Горбенко<sup>1</sup>, Д. В. Ломаев<sup>1</sup>,  
академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, М. М. Ерохин<sup>1,\*</sup>

Поступило 20.04.2022 г.  
После доработки 20.05.2022 г.  
Принято к публикации 20.05.2022 г.

Репрессоры транскрипции группы Polycomb (PcG) и активаторы группы Trithorax (TrxG) необходимы для правильного развития и поддержания профилей экспрессии генов у многоклеточных организмов. У *Drosophila* белки PcG/TrxG взаимодействуют с ДНК-элементами, названными PRE (Polycomb response elements). Ранее мы показали, что репрессорную активность PRE-элементов в трансгенах можно вызывать встраиванием рядом с PRE сайтов связывания для архитектурных белков. Было продемонстрировано, что индукция репрессии сопряжена с привлечением белков PcG/TrxG, в том числе ДНК-связывающих факторов Pho и Combgar. В настоящем исследовании мы проверили взаимодействие двух других PRE-ассоциированных ДНК-связывающих факторов, GAF и Psq, с *bxd*PRE в присутствии и в отсутствие сайтов для архитектурных белков. В результате было показано, что оба фактора могут эффективно привлекаться на *bxd*PRE только в присутствии расположенных рядом сайтов связывания для архитектурных белков Su(Hw), CTCF либо Pita.

**Ключевые слова:** *Drosophila*, Polycomb, PRE, репрессия транскрипции, Su(Hw), CTCF, Pita, GAF, Psq

**DOI:** 10.31857/S2686738922050067

Эпигенетический контроль экспрессии генов необходим для правильного развития и жизнедеятельности многоклеточных организмов. Важными эпигенетическими регуляторами транскрипции являются белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG), которые отвечают за реессию и активацию транскрипции соответственно. Нарушения функционирования систем регуляции транскрипции белками PcG/TrxG связаны со многими патологическими состояниями, такими как онкологические заболевания, что делает необходимым понимание механизма их действия, в том числе принципов привлечения на хроматин [1–5].

У *Drosophila* белки PcG/TrxG взаимодействуют со специализированными ДНК-элементами PRE (Polycomb Response Elements), называемыми также сайленсерами [6–8]. В экспериментах с трансгенными конструкциями было показано, что отдельно взятый PRE-элемент может привлекать белки PcG/TrxG и вызывать реессию репортерного гена. Однако функциональная активность PRE очень сильно зависит от геномного окружения, и репрессия наблюдается примерно в половине трансгенов, тогда как в остальных случаях PRE может либо быть в нейтральном статусе (не влиять на активность репортерного гена), либо активировать транскрипцию. При этом важно отметить, что белки PcG/TrxG могут привлекаться на ДНК-последовательность PRE вне зависимости от его статуса, однако может меняться уровень их ассоциации с хроматином [9]. Вопрос о том, каким образом контролируется активность

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: yermahbio@yandex.ru

PRE, в настоящее время является предметом активных научных исследований.

Ранее нами было показано, что вставка сайтов связывания для архитектурных белков (Su(Hw), CTCF либо Pita) рядом с PRE может усиливать или даже индуцировать PRE-зависимую репрессию гена-мишени [10]. При этом индукция репрессии сопряжена с привлечением белков PcG (Ph, Sfmtb), TrxG (Trx, CBP), а также двух PRE-ассоциированных ДНК-связывающих факторов — Pho и Combgar. В то же время остается не известным, связываются ли с ДНК-последовательностью PRE в неактивном состоянии другие ДНК-ассоциированные факторы. Потенциально возможны два варианта. В первом случае можно ожидать, что в отсутствие сайтов для архитектурных белков область PRE остается прочно ассоциирована с нуклеосомами и является недоступной для любых контактов с ДНК-связывающими белками. Во втором варианте с областью PRE может взаимодействовать ограниченное число транскрипционных факторов, но их недостаточно для привлечения полноценного комплекса PcG/TrxG белков.

В настоящей работе мы проверили ассоциацию с PRE двух ДНК-связывающих белков, GAF и Psq, в нейтральном статусе и при активации репрессии. Оба фактора связываются с (GA)<sub>n</sub>-повторами (GAGA-сайтами), узнавая одни и те же мотивы в составе PRE и являются прямыми физическими партнерами, взаимодействуя друг с другом через ВТВ-домены [11]. Более того, для GAF было продемонстрировано, что он является пионерным транскрипционным фактором и, по крайней мере, на ряде геномных позиций может вызывать привлечение ремоделеров хроматина и способствовать связыванию различных функциональных комплексов с ДНК [11]. Таким образом, задачей данного исследования была проверка способности пионерного фактора GAF, а также его партнера Psq, взаимодействовать с неактивным *bxd*PRE в отсутствие расположенных рядом сайтов связывания для архитектурных белков.

Тестирование зависимости привлечения белков GAF и Psq от сайтов связывания архитектурных белков проводилось на разработанной ранее модельной системе [10]. Все используемые в данном исследовании трансгены были встроены в область генома 96E на третьей хромосоме с помощью системы сайт-специфической интеграции PhiC31 путем рекомбинации между сайтом attB, содержащимся в плазмиде, и сайтом attP, ранее встроеным в геном с помощью транспозона Mariner [12]. В качестве модельного PRE в данной работе во всех трансгенных конструкциях использовался хорошо охарактеризованный элемент *bxd*PRE длиной 656 п.н. из регуляторной об-

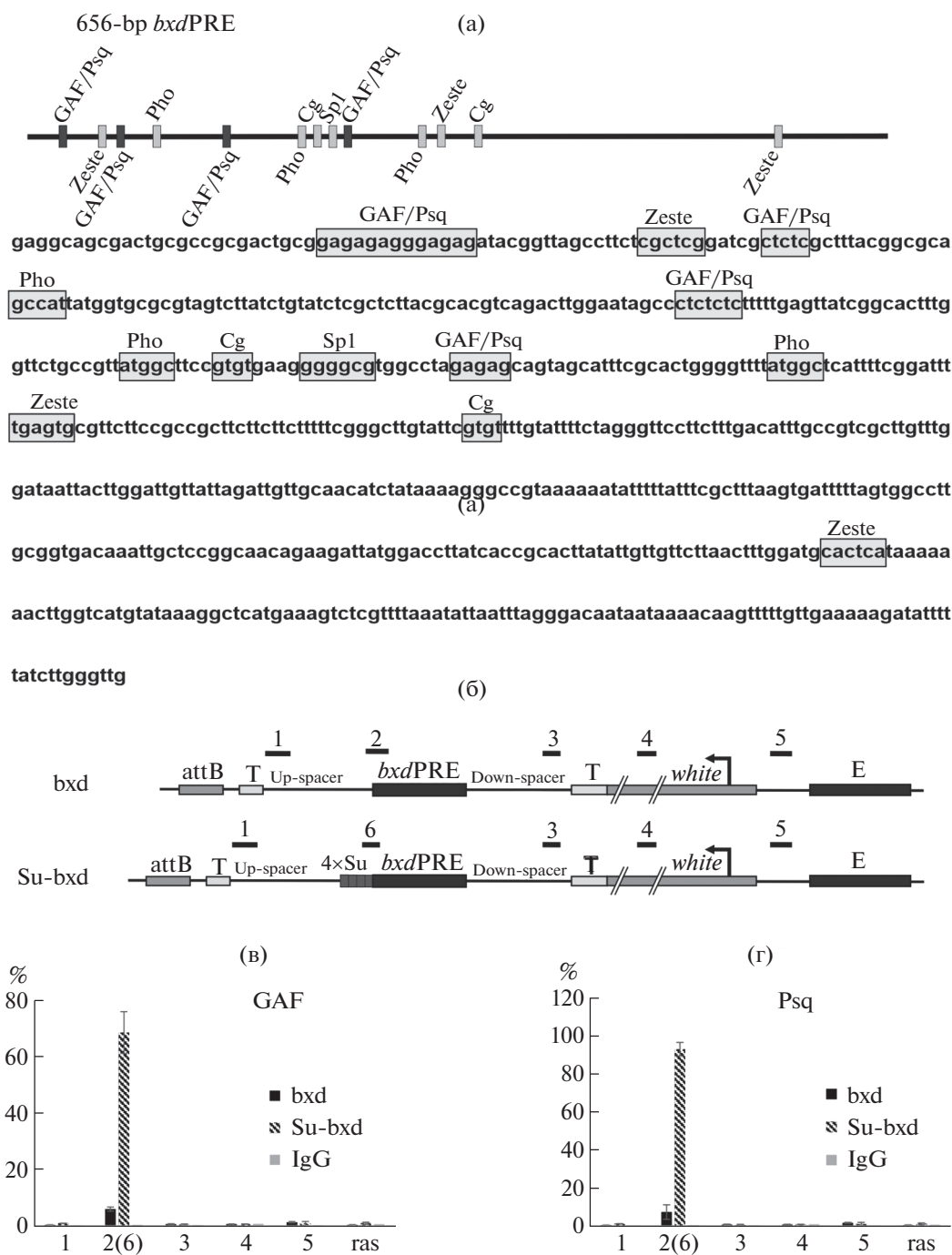
ласти гена *Ubx* [9]. На рис. 1 а представлена последовательность *bxd*PRE и указаны сайты для PRE ДНК-связывающих белков: GAF/Psq — GAGAG [13, 14]; Pho — GCCAT [15, 16]; Zeste — YGAGYG (Y = C or T) [17, 18]; Sp1/Klf — RRGYG (R = A or G) [19]; Combgar (Cg) — GTGT [20].

Базовый трансген, названный *bxd* (рис. 1 б), содержит следующие функциональные элементы: сайт attB, сайленсер *bxd*PRE, репортерный ген *white* и тканеспецифичный энхансер гена *white* (E). Кроме того, *bxd*PRE в трансгене окружен ДНК-спейсерами длиной примерно 1 т.п.н. каждый, полученными из кодирующих областей генов eGFP и RFP, а также терминаторами транскрипции (с 5'-стороны от *bxd*PRE встроены терминатор SV40 и с 3'-стороны от *bxd*PRE — терминатор гена *yellow*).

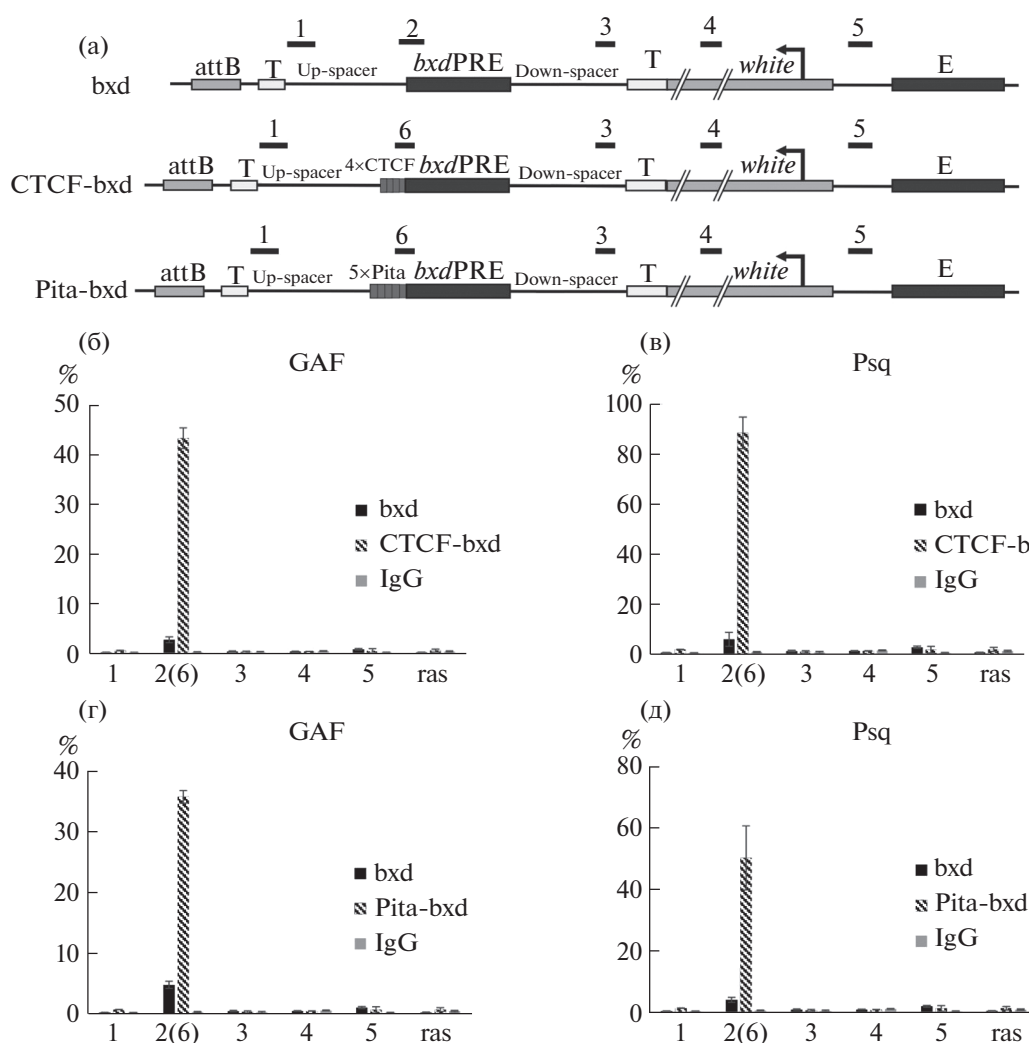
Второй трансген, названный Su-*bxd* (рис. 1 б), содержит все элементы трансгена *bxd*, но вплотную с 5'-стороны от *bxd*PRE, встроены 4 сайта связывания для архитектурного белка Su(Hw) (4xSu).

Ген *white* отвечает за пигментацию глаз мух и необходим для оценки репрессорной активности сайленсера *bxd*PRE. Тканеспецифичный энхансер используется для повышения уровня экспрессии гена *white*, что необходимо для работы с трансгенами, содержащими репрессорные элементы, эффективно подавляющие транскрипцию репортерных генов. Фенотип глаз трансгенных мух напрямую коррелирует с уровнем транскрипции гена *white* [9]. В случае отсутствия репрессии фенотип глаз трансгенных мух будет красным, в случае наличия репрессии — пигментация глаз будет снижена вплоть до белой окраски в зависимости от степени репрессии.

Ранее нами было показано, что в составе трансгена *bxd* элемент *bxd*PRE находится в нейтральном статусе — не репрессирует транскрипцию (фенотип глаз трансгенных мух в геми- и гомозиготе красный) и не привлекает белки групп PcG/TrxG и PRE-ассоциированные ДНК-связывающие факторы Pho и Combgar. В то же время в составе трансгена Su-*bxd*, при добавлении четырех сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw), *bxd*PRE эффективно репрессирует ген *white* (фенотип глаз трансгенных мух коричневый в гемизиготе и светло-желтый в гомозиготе). Репрессия сопровождается привлечением белков PcG/TrxG, в том числе двух PRE-ассоциированных ДНК-связывающих белков Pho и Combgar. Кроме того, экспериментально было подтверждено, что в конструкции Su-*bxd* происходит привлечение Su(Hw) на 4xSu сайты [10].



**Рис. 1.** (а) Предсказанные сайты связывания известных PRE-ассоциированных ДНК-связывающих белков сайленсера *bxdPRE* длиной 656 п.н. (б) Схематическое изображение трансгенов. Обозначения: “attB” – сайт attB, необходимый для интеграции трансгена; “*bxdPRE*” – сайленсер *bxdPRE*; “Т” – терминаторы транскрипции; *white* – репортерный ген; “Е” – энхансер гена *white*, “4xSu” – четыре сайта связывания белка Su(Hw). Числа над схемами трансгенов (1, 2 или 6, 3, 4, 5) обозначают области, амплифицированные с помощью количественной ПЦР (qPCR) в экспериментах X-ChIP. (в, г) Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина, выделенного из голов взрослых мух, гомозиготных по трансгенам “*bxd*” и “*Su-bxd*”. Эксперименты проводились с использованием антител против белков GAF (в) и Psq (г), либо с неспецифическими IgG неиммунизированного животного (IgG). По оси ординат указан процент обогащения каждой области в иммунопреципитированном материале по отношению к исходной ДНК (Input), нормированный на эндогенный позитивный контроль – область рядом с 656 п.н. *bxdPRE* в геноме (*bxdPRE*-Genome). По оси абсцисс – области исследования с помощью qPCR в трансгене и отрицательный контроль (*ras* – кодирующая область гена Ras64B). Вертикальные линии указывают стандартные отклонения.



**Рис. 2.** (а) Схематическое изображение трансгенов. Обозначения: “4хCTCF” – четыре сайта связывания белка CTCF, “5хPita” – пять сайтов связывания белка Pita. (б, в) Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина, выделенного из голов взрослых мух, гомозиготных по трансгенам “*bxd*” и “*CTCF-bxd*”. Были использованы специфические антитела к белкам GAF (Б), Psq (В). (г, д) Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина, выделенного из голов взрослых мух, гомозиготных по трансгенам “*bxd*” или “*Pita-bxd*”. Были использованы специфические антитела к белкам GAF (Г), Psq (Д). Остальные обозначения как на рис. 1.

В данной работе с помощью иммунопреципитации хроматина (X-ChIP), выделенного из голов гомозиготных трансгенных мух, мы проверили ассоциацию белков GAF и Psq с *bxdPRE* в трансгенах *bxd* и *Su-bxd* на взрослой стадии развития. Мы оценивали обогащение исследуемых белков на пяти областях трансгенов: (1) дистальный конец спейсерной последовательности перед *bxdPRE*, (2) *bxdPRE*, (3) дистальный конец последовательности спейсера после *bxdPRE*, (4) кодирующая область гена *white* и (5) промотор гена *white* (рис. 1 б). В качестве отрицательного внутреннего контроля был использован участок кодирующей области гена *Ras64B* (*ras*), в качестве положитель-

ного внутреннего контроля была выбрана область *bxdPRE-Genome* – область, связывающая белки GAF/Psq рядом с *bxdPRE* в геноме, но не входящая в состав *bxdPRE* в трансгенах. Проведенный анализ показал, что белок GAF, также как и белок Psq, не взаимодействует с неактивным *bxdPRE* в составе трансгена *bxd* (рис. 1 в). В то же время данные белки эффективно привлекаются на сайленсер *bxdPRE* в статусе репрессии в составе трансгена *Su-bxd* в присутствии сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw).

На следующем этапе мы изучили взаимодействие белков GAF и Psq с сайленсером *bxdPRE*

при его индукции альтернативными архитектурными белками – CTCF или Pita. Для этого рядом с *bxd*PRE были встроены либо 4 сайта связывания архитектурного белка CTCF (трансен *CTCF-bxd*, рис. 2 а), либо 5 сайтов связывания архитектурного белка Pita (трансен *Pita-bxd*, рис. 2 а). В предыдущем исследовании мы показали, что сайты связывания данных архитектурных белков функционально ведут себя также, как и сайты связывания для белка Su(Hw) – в их присутствии активируется репрессорная активность *bxd*PRE. Как и в случае трансгена *Su-bxd*, обогащение белков GAF и Psq проверялось с помощью X-ChIP на пяти аналогичных областях трансгенов *CTCF-bxd* и *Pita-bxd*. Как и ранее, хроматин для иммунопреципитации был выделен из голов гомозиготных по конструкции мух на взрослой стадии развития. В качестве контроля все эксперименты проводились параллельно с выделением и иммунопреципитацией хроматина, выделенного из мух, несущих трансген *bxd*. В результате анализа нами было показано, что белки GAF и Psq привлекаются на элемент *bxd*PRE только в статусе репрессии в присутствии сайтов связывания для архитектурных белков CTCF или Pita (рис. 2 б, д).

Таким образом, мы показали, что в используемой модельной системе пионерный фактор GAF, также как и белок Psq, не взаимодействует с неактивным *bxd*PRE. При этом активация опосредованной *bxd*PRE репрессии маркерного гена при добавлении сайтов связывания для архитектурных белков сопровождается привлечением GAF и Psq. Полученные данные показывают, что, по крайней мере в некоторых ситуациях, GAGA-сайтов недостаточно для привлечения GAGA-ассоциированных белков и, как следствие, взаимодействующих с ними транскрипционных комплексов на хроматин. Интересно, что использование сайтов связывания для всех трех протестированных архитектурных факторов приводит к примерно одинаковому усилению связывания GAF и Psq с *bxd*PRE. Несмотря на то что на сегодня известно около десяти PRE-ассоциированных ДНК-связывающих факторов [7, 8], вопрос о детальном механизме привлечения белков PcG/TrxG на хроматин остается открытым. Результаты данного исследования показывают, что в этих процессах важную роль могут играть не только ранее известные PcG/TrxG-ассоциированные ДНК-связывающие белки, но и различные архитектурные факторы, определяющие трехмерную структуру хроматина в ядре.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-74-10099. В работе была использована инфра-

структура Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Piunti A., Shilatifard A.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021. V. 22. № 5. P. 326–345.
2. *Chetverina D.A., Lomaev D.V., Erokhin M.M.* // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 4. P. 66–85.
3. *Parreno V., Martinez A.M., Cavalli G.* // Cell Res. 2022. V. 32. № 3. P. 231–253.
4. *Cavalli G., Heard E.* // Nature. 2019. V. 571. № 7766. P. 489–499.
5. *Erokhin M., Chetverina O., Gyorffy B., et al.* // Cancers (Basel). 2021. V. 13. № 13. P. 3155.
6. *Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W.* // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725.
7. *Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D.* // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1–24.
8. *Kassis J.A., Brown J.L.* // Adv. Genet. 2013. V. 81. P. 83–118.
9. *Erokhin M., Elizar'ev P., Parshikov A., et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935.
10. *Erokhin M., Gorbenko F., Lomaev D., et al.* // BMC Biol. 2021. V. 19. № 1. P. 113.
11. *Chetverina D., Erokhin M., Schedl P.* Cell Mol. Life Sci. 2021. V. 78. № 9. P. 4125–4141.
12. *Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
13. *van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 5. P. 2580–2585.
14. *Lehmann M., Siegmund T., Lintermann K.G., et al.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 43. P. 28504–28509.
15. *Fritsch C., Brown J.L., Kassis J.A., et al.* // Development. 1999. V. 126. № 17. P. 3905–3913.
16. *Brown J.L., Kassis J.A.* // Genetics. 2013. V. 195. № 2. P. 407–419.
17. *Biggin M.D., Bickel S., Benson M., et al.* // Cell. 1988. V. 53. № 5. P. 713–722.
18. *Moses A.M., Pollard D.A., Nix D.A., et al.* // PLoS Comput. Biol. 2006. V. 2. № 10. P. e130.
19. *Brown J.L., Grau D.J., DeVido S.K., et al.* // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. № 16. P. 5181–5189.
20. *Ray P., De S., Mitra A., et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831.

## RECRUITMENT TO CHROMATIN OF (GA)<sub>n</sub>-ASSOCIATED FACTORS GAF AND Psq IN THE TRANSGENIC MODEL SYSTEM DEPENDS ON THE PRESENCE OF ARCHITECTURAL PROTEIN BINDING SITES

D. A. Chetverina<sup>a</sup>, F. V. Gorbenko<sup>a</sup>, D. V. Lomaev<sup>a</sup>,  
Academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>a</sup>, and M. M. Erokhin<sup>a,#</sup>

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

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

Polycomb group (PcG) repressors and Trithorax group (TrxG) activators of transcription are essential for the proper development and maintenance of gene expression profiles in multicellular organisms. In *Drosophila*, PcG/TrxG proteins interact with DNA elements called PRE (Polycomb response elements). We have previously shown that the repressive activity of inactive PRE in transgenes can be induced by architectural protein binding sites. It was shown that the induction of repression is associated with the recruitment of PcG/TrxG proteins, including the DNA-binding factors Pho and Combgap. In the present study, we tested the association of the two other PRE DNA-binding factors, GAF and Psq, with *bxd*PRE in the presence and absence of sites for architectural proteins. As a result, it was shown that both factors can be efficiently recruited to the *bxd*PRE only in the presence of adjacent binding sites for architectural proteins Su(Hw), CTCF, or Pita.

**Keywords:** *Drosophila*, Polycomb, PRE, repression of transcription, Su(Hw), CTCF, Pita, GAF, Psq



УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

## ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА ЦИТОХРОМА Р450 3А4 С ПОМОЩЬЮ МОДИФИКАЦИИ ЭЛЕКТРОДА ПРОСТРАНСТВЕННО-УПОРЯДОЧЕННЫМИ НАНОСТРУКТУРАМИ НА ОСНОВЕ АНОДНОГО ОКСИДА АЛЮМИНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2022 г. В. В. Шумянцева<sup>1,2,\*</sup>, П. И. Королева<sup>1</sup>, А. А. Гилеп<sup>1,3</sup>, К. С. Напольский<sup>4</sup>, Ю. Д. Иванов<sup>1</sup>, С. Л. Канащенко<sup>1</sup>, академик РАН А. И. Арчаков<sup>1,2</sup>

Поступило 15.06.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принято к публикации 11.07.2022 г.

Предложен новый подход для модификации электродов с использованием пористых мембран на основе анодного оксида алюминия, содержащих сонаправленные поры диаметром 0.1 и 0.2 мкм и мембраноподобного вещества дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ) для исследования электрокаталитической эффективности системы. Такой подход позволяет увеличить каталитическую эффективность цитохрома Р450 3А4 в реакции N-деметилования эритромицина на 132% при использовании мембраны с порами 0.1 мкм и на 32% при использовании аналогичной мембраны с размером пор 0.2 мкм. Модификация электродов с помощью пористых мембран смещает потенциал электрохимического восстановления и катализа цитохрома Р450 3А4 в анодную область на 0.070–0.050 В, что свидетельствует о термодинамически более выгодном процессе электронного транспорта и ферментативного электрокатализа.

**Ключевые слова:** цитохром Р450 3А4, пористая мембрана, электрокатализ, эритромицин, биоэлектрохимия, анодный оксид алюминия

**DOI:** 10.31857/S2686738922050298

Ферменты играют важную роль в исследовании биохимии метаболических путей и патологических процессов, в медицинской диагностике, в синтезе лекарственных препаратов (антибиотиков, стероидных гормонов, прекурсоров), в фармакологии в качестве лекарственных препаратов, в разработке (био)сенсорных и диагностических систем, в агротехнике, в промышленном химическом синтезе, в пищевой промышленности [1].

Среди ферментных систем цитохромы Р450 активно исследуются вследствие высокой функциональной и медицинской значимости. Цитохромы Р450 – гем-тиолатные монооксигеназы, катализирующие большое число различных типов химических реакций, и присутствующие во всех классах живых организмов. Широкая субстратная специфичность цитохромов Р450 позволяет использовать их для получения фармакологически значимых препаратов [2, 3]. Главным ограничением в реализации такого биотехнологического подхода является использование дополнительных редокс-партнерных белков и НАДФН в качестве источника электронов для реконструируемых систем. В электрохимических системах донором электронов является электрод. Для создания эффективных электрохимических цитохром Р450-систем были разработаны различные типы электродов и материалы для их модификации, основной задачей которых является сохранение нативной структуры фермента и его каталитической активности [4, 5]. Имобилизация белка на рабочей поверхности электрода необходима для эффективного электронного транспорта

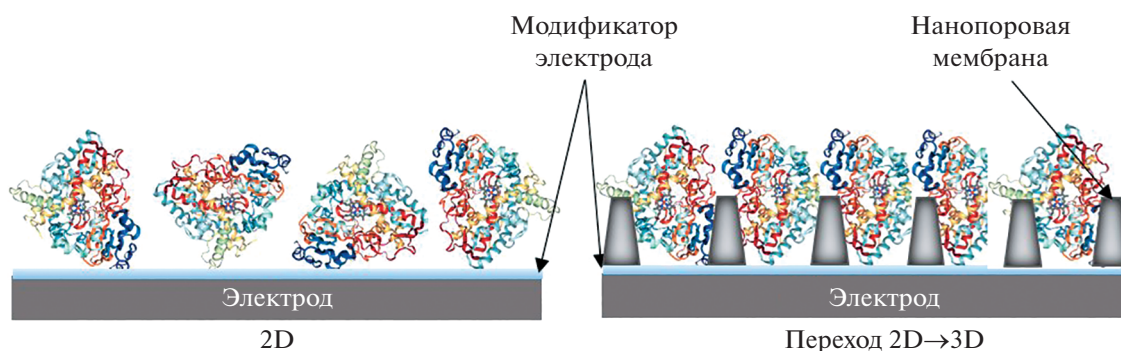
<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>4</sup> Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru



**Схема 1.** Модификация электрода с помощью высокоорганизованных и регулярных нанопор на основе анодного оксида алюминия (Anodisc).

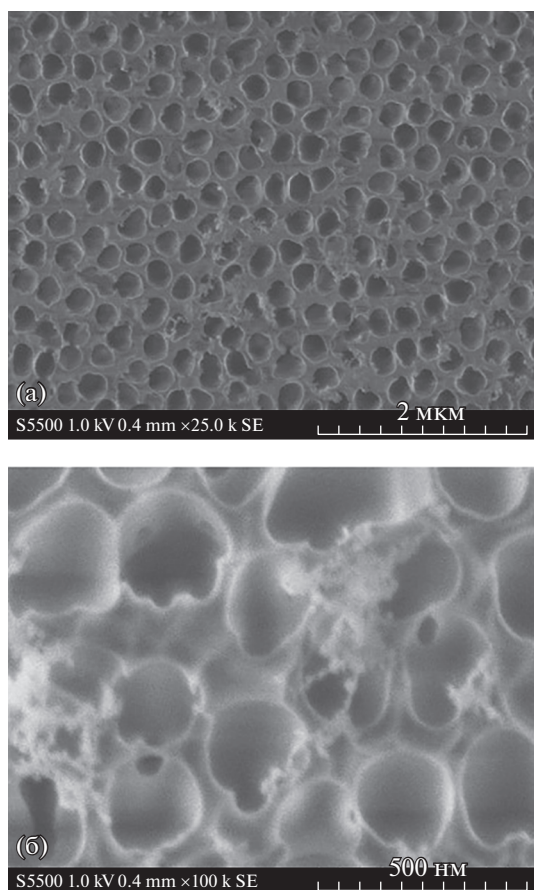
и обмена реакционной среды. Однако при этом существует проблема взаимодействия белка с “твердыми” двумерными (2D) поверхностями, что может приводить к денатурации белка [6]. Ключевым моментом электроанализа является обоснованный выбор типа электродов для наиболее эффективного процесса переноса электронов и регистрации молекулы, биохимического события, каталитического тока как индикатора электрокатализа [5, 7]. При работе с “твердыми” электродами модификация рабочей поверхности (например, мембраноподобными, поверхностно-активными соединениями) не только способствует более эффективному электронному транспорту, но может приводить к стабилизации третичной структуры белка. Новизной подхода, предложенного в данной работе, является включение фермента в трехмерную структуру пористой мембраны, помещенной на рабочий электрод. При этом осуществляется переход от 2D к 3D типу электрода, что может способствовать стабилизации структуры белка и повышению его удельной каталитической активности.

В качестве трехмерного пористого материала (3D) нами были использованы мембраны из анодного оксида алюминия, содержащие сонправленные поры диаметром 0.1 мкм (Anodisc 13, Whatman 0.1 μm, cat No. 6809-7013) и 0.2 мкм (Anodisc 13, Whatman 0.2 μm, cat No. 6809-7023). Дизайн электрохимического эксперимента позволяет включить фермент в 3D-нанопоры на плоском электроде, осуществить 2D → 3D переход матрицы и эффективно исследовать каталитическую активность цитохрома Р450 3А4 (схема 1). Главными преимуществами мембраны на основе анодного оксида алюминия являются химическая стабильность, высокоорганизованная и регулярная структура нанопор, а также коммерческая доступность. На рис. 1 приведены микрофотографии используемой мембраны с порами диаметром 0.1 мкм, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Мем-

брана имеет регулярное расположение пор для эффективного включения исследуемого белка. Средний размер мономеров цитохромов Р450 лежит в нанометровом диапазоне [8], что позволяет предположить возможность включения белка в поры.

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB 302 N (Metrohm Autolab, Нидерланды), снабженного программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе использовали трехконтактные электроды с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения (ПГЭ – печатный графитовый электрод), полученные методом трафаретной печати, (ColorElectronics, Россия). Диаметр рабочего электрода 2 мм. Для изготовления мембраны соответствующего диаметра анодный оксид алюминия нарезали на круги с помощью волоконного лазера “МиниМаркер 2”. В экспериментах по регистрации электрокаталитической активности цитохрома Р450 3А4 использовали циклическую вольтамперометрию (ЦВА) и горизонтальное расположение электродов. Все электрохимические измерения проводили при комнатной температуре в 100 мМ калий-фосфатном буфере с 50 мМ NaCl в качестве фонового электролита, рН 7.4.

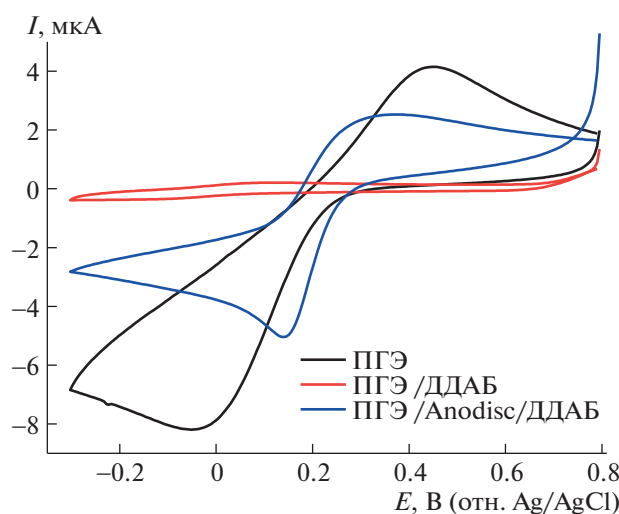
Электроактивная площадь ПГЭ и модифицированных электродов была рассчитана по уравнению Рэндлса-Шевчика [9, 10] с использованием внешнего электролита 5 мМ раствора гексацианоферрата калия. Было зарегистрировано увеличение электроактивной площади электрода при модификации мембранами из анодного оксида алюминия (Anodisc 0.1 мкм) и ДДАБ по сравнению с немодифицированным электродом и электродом, модифицированным только ДДАБ (рис. 2). Электроаналитические характеристики электродов, модифицированных мембранами из анодного оксида алюминия (Anodisc 0.1 мкм) и ДДАБ, продемонстрировали существенное увеличение



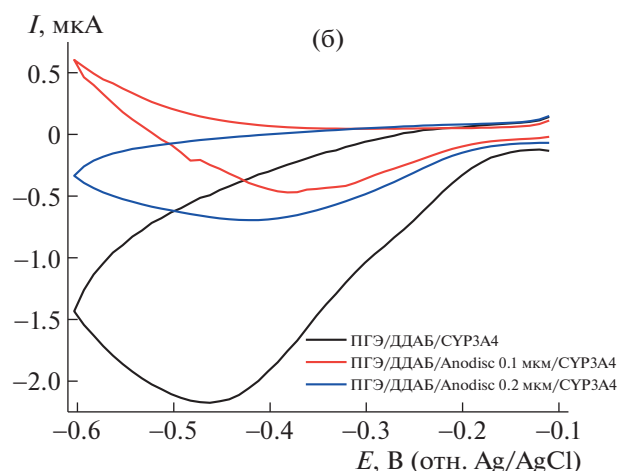
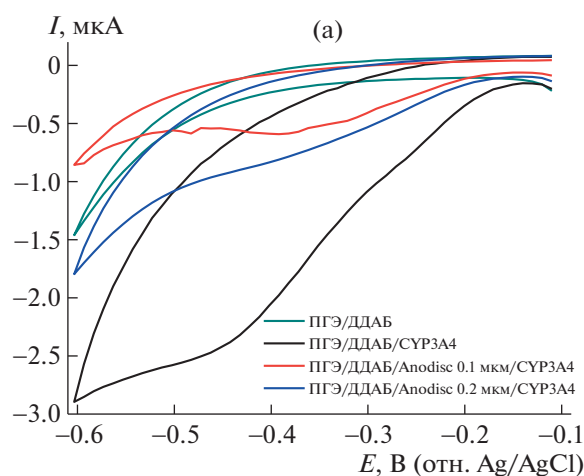
**Рис. 1.** Микрофотографии пористой мембраны, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S 5500 при различных увеличениях 2 мкм (а) и 500 нм (б).

электроактивной площади модифицированных электродов (в 2.5 и 103 раза соответственно) по сравнению с немодифицированным электродом и электродом, модифицированным ДДАБ, что говорит об эффективности использования мембраны с порами субмикронного размера (0.0014, 0.000034 и 0.0035 см<sup>2</sup> для ПГЭ, ПГЭ/ ДДАБ и ПГЭ/Anodisc 0.1 мкм/ ДДАБ соответственно).

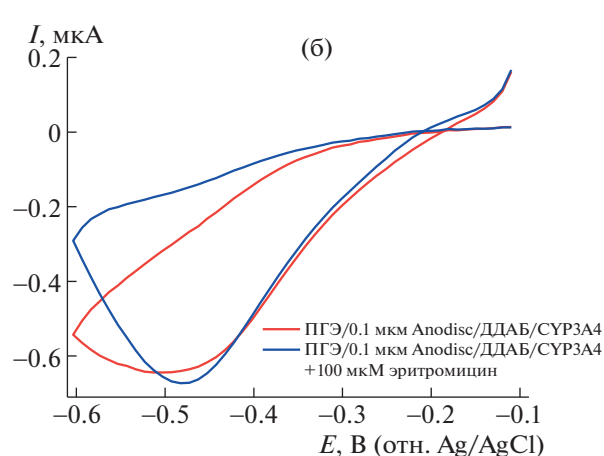
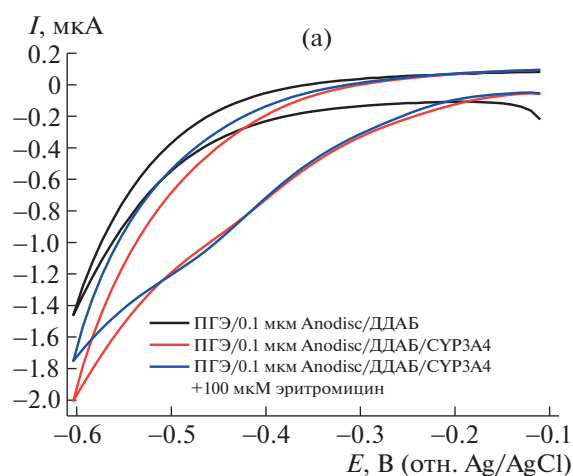
Электроды с иммобилизованными рекомбинантными изоформами цитохромов P450 являются эффективными инструментами при поиске новых субстратов, ингибиторов, активаторов этого класса гемопротеинов [11–14]. Антибиотик из группы макролидов эритромицин (ЭР) является субстратом цитохрома P450 3A4 (CYP3A4) и используется для сравнительного анализа каталитической активности этой изоформы [14]. Для анализа электрохимического восстановления цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде как источнике электронов, на поверхность рабочего электрода помещали мембрану из анодного оксида алюминия соответствующего диаметра, содержащую поры со средним диаметром 0.1 или 0.2 мкм, затем наносили 2 мкл 0.1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл 142 мкМ цитохрома P450 3A4. На рис. 3А и 3Б приведены сравнительные ЦВА цитохрома P450 3A4 в диапазоне потенциалов –0.1–0.6 В. При вычитании фоновой ЦВА электрода без фермента (ПГЭ/ДДАБ) получены более четкие вольтамперограммы, демонстрирующие смещение потенциала восстановления гемопротеина при использовании пористой мембраны в анодную область потенциалов, что свидетельствует о термодинамически более



**Рис. 2.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ и ПГЭ/ДДАБ и ПГЭ/Anodisc 0.1 мкм/ ДДАБ при скорости развертки потенциала 0.05 В/с. Измерения проводили в горизонтальном режиме, в 100 мкл 5 мМ раствора гексацианоферрата калия. Диапазон потенциалов –0.3–+1 В.



**Рис. 3.** (а) Циклические вольтамперограммы (ЦВА) цитохрома Р450 3А4 иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ (—), ПГЭ/Anodisc 0.1 мкм/ДДАБ (—) и ПГЭ/Anodisc 0.2 мкм/ДДАБ (—). (б) Циклические вольтамперограммы цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ/ДДАБ (—), ПГЭ/Anodisc 0.1 мкм/ДДАБ (—) и ПГЭ/Anodisc 0.2 мкм/ДДАБ (—), с вычитанием соответствующей фоновой кривой. Скорость сканирования 0.1 В/с.



**Рис. 4.** (а) Циклические вольтамперограммы цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ/Anodisc 0.1 мкм/ДДАБ (—), при добавлении субстрата эритромицина (—), ПГЭ/ДДАБ (—). (б) Циклические вольтамперограммы цитохрома Р450 3А4, иммобилизованного на ПГЭ/Anodisc 0.1 мкм/ДДАБ (—) при добавлении субстрата эритромицина (—), с вычитанием фоновой кривой ПГЭ/ДДАБ. Скорость сканирования 0.1 В/с.

выгодном процессе электрохимического восстановления иона железа гема цитохрома Р450 3А4 [15] в соответствии со схемой  $\text{Fe(III)} + e \rightleftharpoons \text{Fe(II)} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(II)O}_2$  [3, 11, 14].

Эффективность электрокатализа оценивали по накоплению продукта цитохром Р450 3А4 реакции N-деметилирования эритромицина – формальдегида [16].

Как следует из табл. 1, использование мембран из анодного оксида алюминия (Anodisc 0.1 и 0.2 мкм) для модификации электрода позволяет сместить потенциал восстановления цитохрома Р450 3А4 и потенциал катализа эритромицина в анодную область, что способствует процессу переноса электронов между электродом и активным центром фермента и делает его термодинамически более выгодным [4, 15]. Несмотря на меньшее

количество электроактивного белка на ПГЭ/Anodisc 0.1/ДДАБ/СУР3А4, (параметр  $\Gamma_0$ , моль/см<sup>2</sup>) каталитическая активность такой системы существенно превышает ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4 (232%). Этот эффект может отражать сохранение каталитической активности фермента в порах пространственно-упорядоченных структур на основе анодного оксида алюминия.

Включение фермента в поры анодного оксида алюминия с диаметром 0.1 и 0.2 мкм позволило повысить эффективность электрокатализа за счет перехода от двумерной поверхности планарного электрода к трехмерной объемной структуре рабочего электрода с субмикронным диаметром пор.

Таким образом, нами был разработан новый подход к повышению каталитической актив-

**Таблица 1.** Электрохимические характеристики и сравнение каталитической активности цитохрома P450 3A4

Электрод	E <sub>red</sub> , В	E <sub>cat</sub> , В	Γ <sub>0</sub> , моль/см <sup>2</sup>	I <sub>cat</sub> /I <sub>red</sub>	Относительная эффективность катализа, %
ПГЭ/ДДАБ/СУР3А4	-0.432 ± 0.008	-0.450 ± 0.005	3.94 ± 0.69 × 10 <sup>-11</sup>	0.99 ± 0.21	100 ± 9
ПГЭ/Anodisc 0.1/ДДАБ/СУР3А4	-0.368 ± 0.005	-0.385 ± 0.021	7.11 ± 4.79 × 10 <sup>-12</sup>	1.12 ± 0.8	232 ± 4
ПГЭ/Anodisc 0.2/ДДАБ/СУР3А4	-0.355 ± 0.025	-0.402 ± 0.017	6.78 ± 2.97 × 10 <sup>-12</sup>	0.77 ± 0.17	132 ± 5

сти цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электродной поверхности, позволяющий перевести процесс переноса электронов в цитохром P450 3A4-электрохимических системах в термодинамически более выгодный режим и существенно увеличить (более чем в 2 раза) каталитическую активность цитохрома P450 3A4 в электрокаталитической реакции N-деметилирования макролидного антибиотика эритромицина.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при использовании уникальной научной установки “Авогадро” и при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение No. 075-15-2021-933, уникальный идентификатор проекта RF00121X0004).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh R.S., Singh T., Singh A.K. Enzymes as Diagnostic Tools. In: Singh R.S., Singhania R.R., Pandey A., Larroche C. editors. Biomass, Biofuels, Biochemicals // Advances in Enzyme Technology. Amsterdam: Elsevier. 2019. P. 225–271.
2. Bernhardt R., Urlacher V.B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. V. 98. P. 6185–6203.
3. Guengerich F.P. Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano P.R. editor. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 4th ed. New York: Springer. 2015. P. 523–785.
4. Schneider E., Clark D.S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors // Biosensors and Bioelectronics. 2013. V. 39. № 1. P. 1–13.
5. Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Булко Т.В., и др. Электроанализ биомолекул: обоснованный выбор сенсорных конструкций // Успехи биологической химии. 2021. Т. 61. С. 295–316.
6. Gray J.J. The interaction of proteins with solid surfaces // Curr. Opin. Structur. Biol. 2004. V. 14. № 1. P. 110–115.
7. Kuzikov A.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., et al. Electroanalytical and electrocatalytic characteristics of cytochrome P450 3A4 using electrodes modified with nanocomposite carbon nanomaterials // Biomedical Chemistry. V. 66. № 1. 2020. P. 64–70.
8. Tempel W., Grabovec I., MacKenzie F. et al. Structural characterization of human cholesterol 7α-hydroxylase // J Lipid Res. 2014. V. 55. № 9. P. 1925–1932.
9. Randles J.E.B. A cathode-ray polarograph. Part II – The current-voltage curves // Trans Faraday Soc. 1948. V. 44. P. 327.
10. Chen H.C., Chang C.C., Yang K.H. et al. Polypyrrole electrode with a greater electroactive surface electrochemically polymerized in plasmon-activated water // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2018. V. 82. P. 252–260.
11. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors // J. Inorg. Biochem. 2005. V. 99. № 5. P. 1051–1063.
12. Johnson D.L., Lewis B.C., Elliot D.J., et al. Electrochemical characterization of the human cytochrome P450 CYP2C9 // Biochem. Pharmacol. 2005. V. 69. № 10. P. 1533–1541.
13. Lu J., Cui D., Li H., et al. Cytochrome P450 bienzymes assembled on Au/chitosan/reduced graphene oxide nanosheets for electrochemically-driven drug cascade metabolism // Electrochim. Acta. 2015. V. 165. P. 36–44.
14. Panicco P., Castrignanò S., Sadeghi S.J., et al. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response // Bioelectrochemistry. 2021. V. 138. Art. num. 107729.
15. Rusling J.F., Wang B., Yun S. Electrochemistry of redox enzymes. In: Bartlett P.N. editor. Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd.; 2008. P. 39–85.
16. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction // Biochem J. 1953. V. 55. № 3. P. 416–421.

**INCREASING THE EFFICIENCY OF CYTOCHROME P450 3A4  
ELECTROCATALYSIS USING ELECTRODE MODIFICATION  
WITH SPATIALLY ORDERED ANODIC ALUMINUM OXIDE-BASED  
NANOSTRUCTURES FOR INVESTIGATION OF METABOLIC  
TRANSFORMATIONS OF DRUGS**

**V. V. Shumyantseva<sup>b,#</sup>, P. I. Koroleva<sup>a</sup>, A. A. Gilep<sup>c</sup>, K. S. Napolskii<sup>d</sup>, Yu. D. Ivanov<sup>a</sup>, S. L. Kanashenko<sup>a</sup>,  
and Academician of the RAS A. I. Archakov<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>d</sup> *Lomonosov Moscow State University Faculty of Chemistry, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: viktorija.shumyantseva@ibmc.msk.ru*

A new approach was proposed for modifying electrodes using porous membranes based on anodic aluminum oxide with pore diameters of 0.1  $\mu\text{m}$  and 0.2  $\mu\text{m}$  and a membrane-like substance didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) to study the electrocatalytic efficiency of the system. This approach allows one to increase the catalytic efficiency of the cytochrome P450 3A4-dependent N-demethylation of erythromycin by 132% when using a membrane with pore diameter of 0.1  $\mu\text{m}$  and by 32% when using a membrane with 0.2  $\mu\text{m}$  pore size. Electrode modification using porous membranes shifted potential of electrochemical reduction and catalysis of cytochrome P450 3A4 in positive direction by 0.070–0.050 V, which indicates a thermodynamically more favorable process of electron transfer and enzymatic electrocatalysis.

*Keywords:* cytochrome P450 3A4, porous membrane, electrocatalysis, erythromycin, bioelectrochemistry, anodic aluminum oxide

УДК 577.2

## ДОСТАВКА АНТИТЕЛОПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ, МОНОБОДИ, СПОСОБНЫХ СВЯЗЫВАТЬСЯ С НУКЛЕОКАПСИДНЫМ БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-COV-2, В КЛЕТКИ-МИШЕНИ

© 2022 г. Ю. В. Храмцов<sup>1</sup>, А. В. Уласов<sup>1</sup>, Т. Н. Лупанова<sup>1</sup>, академик РАН Г. П. Георгиев<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН А. С. Соболев<sup>1,2,\*</sup>

Поступило 15.06.2022 г.

После доработки 07.07.2022 г.

Принято к публикации 11.07.2022 г.

На основании предыдущих исследований были выбраны две антителоподобные молекулы, монободии, способные с высоким сродством (константа диссоциации десятки нМ) взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2. Для доставки в клетки-мишени методами генной инженерии были получены и проэкспрессированы в *E. coli* конструкции, содержащие, кроме монободии, последовательность TAT-пептида на N- или на C-конце полученного полипептида. Методом термофореза была выявлена конструкция с наибольшим сродством к нуклеокапсидному белку вируса SARS-CoV-2. Клеточным анализом теплового сдвига была показана способность данной конструкции взаимодействовать с нуклеокапсидным белком в клетках HEK293T, трансфицированных нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2, слитым с флуоресцентным белком mRuby3. Использование вместо TAT-пептида в полученной конструкции шатл-пептида S10, содержащего кроме улучшенного TAT-пептида еще эндосомолитический пептид, существенно улучшает проникновение конструкции в клетки-мишени.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, TAT-пептид, шатл-пептид S10, нуклеокапсидный белок, антителоподобные молекулы, монободии, термофорез, клеточный анализ теплового сдвига

**DOI:** 10.31857/S2686738922050146

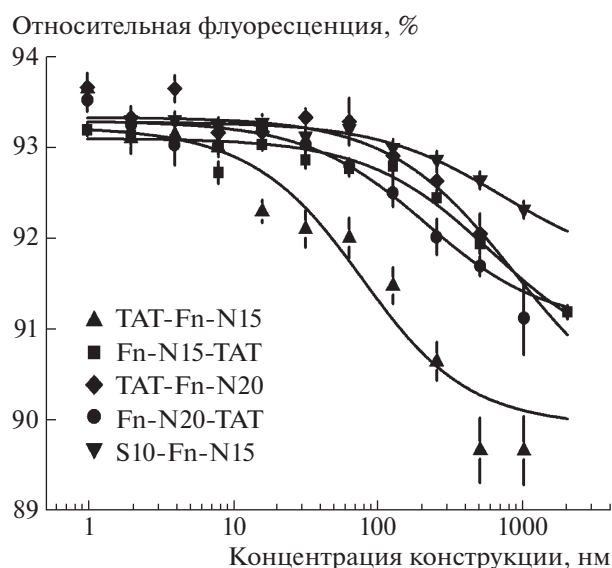
Необходимость разработки новых противовирусных препаратов стала как никогда очевидной на фоне пандемии коронавируса SARS-CoV-2. Наряду с классическими низкомолекулярными ингибиторами вирусной активности [1] весьма перспективным представляется использование противовирусных препаратов, содержащих антитела или антителоподобные молекулы, которые можно получить практически для любого белкового антигена. Антителоподобные молекулы в этом плане могут быть более перспективными в связи с относительно небольшим, по сравнению с природными антителами, размером при сохранении нужной специфичности и аффинности [2]. В качестве мишени можно выбрать один из вирусных белков, критически важных для сборки вируса. Для вируса SARS-CoV-2 таким белком может быть нуклеокапсидный белок или N-белок, кото-

рый связывается с вирусной РНК и принимает активное участие в сборке и упаковке вируса, а также имеет целый ряд других важных для вируса функций [3–5]. В предыдущей работе [6] нами было показано, что несколько антителоподобных молекул, монободии (Fn-N), к N-белку вируса SARS-CoV, созданных на основе десятого домена фибронектина 3 типа человека [7], способны с высоким сродством взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Для неспецифической доставки данных монободии в клетки можно присоединить к ним проникающий в клетку пептид, например, TAT-пептид – пептид из белка транскриптора ВИЧ-1 [8]. Это было сделано для двух монободии Fn-N15 и Fn-N20, причем TAT-пептид был на N- или на C-конце конструкции. Из полученных конструкций отбиралась конструкция с наибольшим сродством к N-белку. Далее изучалась способность данной конструкции связываться с N-белком в клетках HEK293T. Для улучшения эффективности проникновения в клетки изучена также конструкция, содержащая вместо TAT-пептида шатл-пептид S10 [9].

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: alsobolev@yandex.ru



**Рис. 1.** Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (за 100% принята интенсивность флуоресценции до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации полипептидных конструкций при постоянной концентрации N-белка (40 нМ). Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной интенсивности флуоресценции (8–12 повторов).

Генно-инженерными методами были получены четыре плазмиды, каждая из которых содержала ген, кодирующий антителоподобную молекулу с His-тагом и TAT-пептид на N- или на C-конце. Плазмиды, кодирующие N-белок SARS-CoV-2 с His-тагом и N-белок SARS-CoV-2, слитый с флуоресцентным белком mRuby3, были любезно предоставлены компанией ShineGene (Китай) и доктором Raphael Gaudin (Addgene plasmid # 170466) соответственно. Экспрессию антителоподобных молекул, слитых с TAT-пептидом, и N-белка проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3). Индукцию экспрессии Fn-N с TAT и N-белка проводили 500 мкМ IPTG в течение 20 ч при 37°C для Fn-N с TAT и в течение 3 ч при 37°C для N-белка. Fn-N с TAT и N-белок выделяли из нерастворимой фракции [10], а затем очищали аффинной хроматографией на носителях HisTrap FF для Fn-N с TAT и Protino® Ni-TED Resin для N-белка. Выделенные белки хранили в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 8.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученных белков (98.9% для N-белка; 98.8% для TAT-Fn-N15; 96% для Fn-N15-TAT; 61.5% для TAT-Fn-N20; 97.5% для Fn-N20-TAT и 94.4% для S10-Fn-N15).

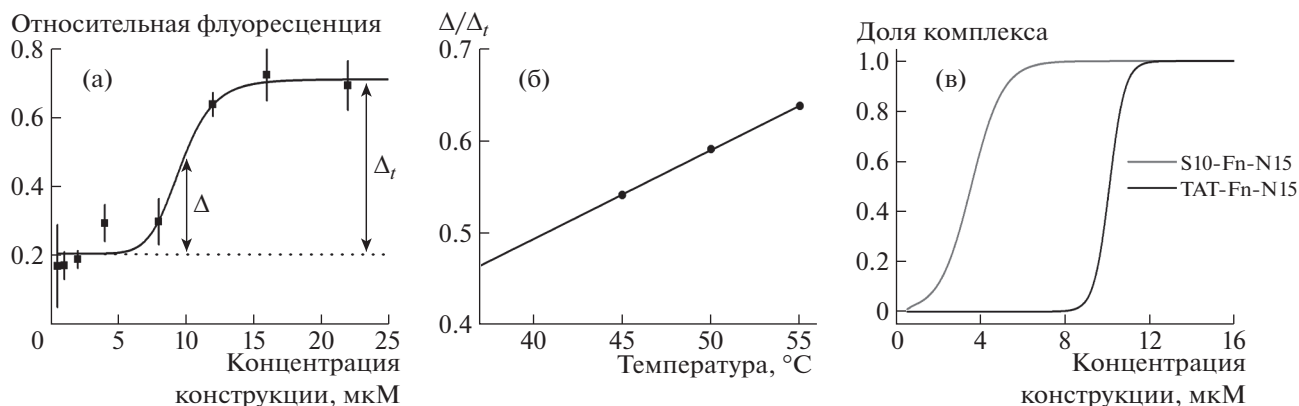
Взаимодействие полученных полипептидных конструкций с N-белком изучали так же, как описано в [6], методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series (“NanoTemper Technologies

GmbH”, Германия) в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7. N-белок был помечен флуоресцентным красителем AF488, подобно тому, как это описано в [6]. Степень модификации составила 2.2 молекулы AF488 на одну молекулу N-белка. Клеточный анализ теплового сдвига проводили на клетках HEK293T, временно трансформированных N-белком, слитым с флуоресцентным белком mRuby3, подобно тому, как описано в [11], с тем исключением, что флуоресценцию образцов измеряли в капиллярах на приборе Monolith NT.115 Series (“NanoTemper Technologies GmbH”, Германия). Для каждой концентрации полипептида образец делили на четыре аликвоты. Количество клеток в аликвотах и процент трансфекции N-белком (20–30%), слитым с красным белком, определяли с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Франция). Одну аликвоту не нагревали, а три другие нагревали до температур 45, 50 и 55°C, соответственно, в течение 3 мин. Далее аликвоты клеток лизировали четырьмя циклами замораживания в жидком азоте — оттаивания при 37°C. Для отделения от клеточных остатков и денатурированных белков лизированные клетки центрифугировали при 8000 g в течение 1 ч. Из флуоресценции каждого из супернатантов вычитали флуоресценцию используемого буфера, и полученную разность нормировали на число клеток в образце. Из такой нормированной флуоресценции вычитали значение фона, полученное для клеток HEK293T, не трансформированных N-белком. Полученное значение флуоресценции нормировали на флуоресценцию образцов, которые не подвергались нагреванию.

При фиксированной концентрации N-AF488 (40 нМ) методом термофореза были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации полученных конструкций (рис. 1). Для каждого эксперимента получали четыре таких зависимости, и весь эксперимент повторяли два-три раза. По каждой кривой определяли константу диссоциации комплекса полипептидной конструкции с N-белком, ее усредняли по всем 8–12 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Константы диссоциации комплексов конструкций с N-белком составили  $46 \pm 5$ ,  $710 \pm 260$ ,  $350 \pm 80$  и  $190 \pm 90$  нМ для конструкций TAT-Fn-N15, Fn-N15-TAT, TAT-Fn-N20 и Fn-N20-TAT соответственно. Таким образом, наилучшее сродство к N-белку наблюдается для конструкции TAT-Fn-N15. Для конструкции S10-Fn-N15 (рис. 1) константа диссоциации с N-белком составила  $700 \pm 270$  нМ.

Для изучения взаимодействия полученных конструкций с N-белком в клетке был использован вариант клеточного анализа теплового сдви-





**Рис. 2.** (а) Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (по отношению к флуоресценции образца, не подвергнувшегося нагреванию) от концентрации конструкции TAT-Fn-N15, полученная нагреванием 3 мин при 50°C. Кривой показана интерполяция сигмоидной зависимостью. (б) Зависимость отношения доли комплекса TAT-Fn-N15 с N-белком,  $\Delta$ , к амплитуде перехода,  $\Delta_f$ , от температуры при 10 мкМ TAT-Fn-N15. Прямой линией показана интерполяция экспериментальных данных до температуры 37°C. (в) Зависимости доли комплекса S10-Fn-N15 или TAT-Fn-N15 с N-белком от концентрации конструкции вне клеток при физиологических условиях.

га, в котором изменяется концентрация добавляемой полипептидной конструкции [12]. Такие зависимости были получены для конструкций TAT-Fn-N15 и S10-Fn-N15 на клетках HEK293T при разных температурах, например, 50°C (рис. 2а). Интерполяция сигмоидной кривой позволяет определить амплитуду перехода,  $\Delta_f$ , и при любой концентрации конструкции – долю комплекса конструкции с N-белком при выбранной температуре,  $\Delta/\Delta_f$  (рис. 2а). Эту долю можно линейной зависимостью экстраполировать до температуры 37°C (рис. 2б) и тем самым получить зависимости доли комплекса конструкции с N-белком от концентрации конструкции вне клеток при физиологических температурах (рис. 2в). Для конструкций TAT-Fn-N15 и S10-Fn-N15 по полученным кривым получили, что  $EC_{50} = 10.1 \pm 0.8$  и  $3.5 \pm 0.8$  мкМ соответственно (рис. 2в).

Таким образом, из четырех полученных конструкций (два монободии и TAT-пептид на N- или C-конце) конструкция TAT-Fn-N15 обладает наибольшим сродством к N-белку вируса SARS-CoV2 (константа диссоциации  $46 \pm 5$  нМ). Клеточным анализом теплового сдвига было показано, что эта конструкция может проникать в клетки HEK293T и взаимодействовать в них с N-белком, слитым с флуоресцентным белком mRuby3. Включение в состав конструкции вместо TAT-пептида шатл-пептида S10 [9], который содержит как улучшенный TAT-пептид, так и эндосомолитический пептид, приводит к уменьшению втрое  $EC_{50}$  (рис. 2в). Несмотря на то что сродство конструкции S10-Fn-N15 к N-белку в 15 раз хуже, чем конструкции TAT-Fn-N15, это с избытком компенсируется увеличением эффективности проникновения в клетки конструкции с S10, по сравнению с конструкцией с TAT-пептидом. Следует

отметить, что ранее шатл-пептид S10 добавляли одновременно с доставляемой конструкцией, т.е. они не образовывали химической связи друг с другом [9]. В настоящей работе было показано, что S10 эффективен и в составе слитых конструкций. Однако в полученной конструкции S10 существенно ухудшает сродство монободии к N-белку. Дальнейшее повышение эффективности конструкции возможно путем повышения этого сродства, например, введением дополнительного спейсера между S10 и монободии или выбором другого монободии.

В результате проведенной работы нами было продемонстрировано, что наибольшей эффективностью взаимодействия с N-белком вируса SARS-CoV-2 в клетках HEK293T обладает конструкция S10-Fn-N15. Данная конструкция потенциально способна стать основным противовирусным препаратом, нацеленным как на SARS-CoV, так и на SARS-CoV-2.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E.D., Li G. // Clin Microbiol Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.

2. Gebauer M., Skerra A. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020. V. 60. P. 391–415.
3. Surjit M., Lal S.K. // *Infect Genet Evol*. 2008. V. 8. P. 397–405.
4. Wu C., Zheng M. // *Preprints*. 2020. P. 2020020247.
5. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al. // *Indian J Pharmacol*. 2020. V. 52. P. 56.
6. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N. et al. // *Dokl Biochem Biophys*. 2022. V. 503. P. 90–92.
7. Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al. // *J Biol Chem*. 2009. V. 284. P. 17512–17520.
8. Reis L.G., Traini D. // *Expert Opin Drug Deliv*. 2020. V. 17. P. 647–664.
9. Krishnamurthy S., Wohlford-Lenane C., Kandimalla S., et al. // *Nat Commun*. 2019. V. 10, P. 4906.
10. Li G., Li W., Fang X., et al. // *Protein Expr Purif*. 2021. V. 186. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105908>
11. Naidu S.D., Dikovskaya D., Moore T.W., et al. // *STAR Protocols*. 2022. V. 3, P. 101265.
12. Molina D.M., Jafari R., Ignatushchenko M., et al. // *Science*. 2013. V. 341. P. 84–87.

## DELIVERY OF ANTIBODY-LIKE MOLECULES, MONOBODIES, CAPABLE OF BINDING WITH SARS-COV-2 VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN, INTO TARGET CELLS

Y. V. Khramtsov<sup>a</sup>, A. V. Ulasov<sup>a</sup>, T. N. Lupanova<sup>a</sup>, G. P. Georgiev<sup>a</sup>,  
and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev<sup>a,b,#</sup>

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

<sup>b</sup> *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

Based on previous studies, there were selected two antibody-like molecules, monobodies, capable of high affinity interaction with the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (dissociation constant of tens of nM). For delivery to target cells, genetically engineered constructs containing monobody and TAT peptide, placed either at the N- or C-terminus of the resulting polypeptide, were produced and expressed in *E. coli*. The construct with the highest affinity to the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein was revealed with the use of thermophoresis technique. Cellular thermal shift assay demonstrated the ability of this construct to interact with the nucleocapsid protein within HEK293T cells transfected with the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein fused to the mRuby3 fluorescent protein. Replacement of TAT peptide to S10 shuttle peptide, containing endosomal peptide, significantly improved the penetration of the construct into the target cells.

**Keywords:** SARS-CoV-2, TAT peptide, S10 shuttle peptide, nucleocapsid protein, antibody-like molecules, monobody, thermophoresis, cellular thermal shift assay

УДК 599.539 + 574.24

## РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИПОВ ПОВЕДЕНИЯ БЕЛУХИ (*Delphinapterus leucas*) ПО ПАРАМЕТРАМ УСКОРЕНИЯ

© 2022 г. О. И. Лямин<sup>1,2,\*</sup>, Е. А. Назаренко<sup>1</sup>, академик РАН В. В. Рожнов<sup>1</sup>

Поступило 06.07.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принято к публикации 10.07.2022 г.

Апробирован неинвазивный инструментальный метод описания поведения белухи (*Delphinapterus leucas*) по параметрам двигательной активности, которую характеризовали средним и стандартным отклонением ускорения хвостового стебля животного. Было установлено, что с помощью алгоритма “дерева решений” могут быть выделены как минимум два типа поведения белух – спокойное зависание у поверхности воды и активное плавание по бассейну. Точность определения (в зависимости от параметра) составляла для спокойного зависания в среднем 81–97%, а для активного плавания – 54–99%. Различия в точности классификации спокойного зависания по 3Д-ускорению и результирующему ускорению были минимальными. В будущем точность может быть повышена использованием других параметров ускорения, уменьшением интервала анализа и оптимизацией алгоритмов классификации.

**Ключевые слова:** поведение, акселерометрия, классификация, алгоритм, дерево решений, белуха, *Delphinapterus leucas*, морские млекопитающие

**DOI:** 10.31857/S2686738922050183

Неинвазивные инструментальные методы оценки поведения животных имеют большой потенциал для исследований в области их экологической физиологии и поведенческой экологии, а также для мониторинга состояния здоровья животных [1, 2]. Одним из параметров, который характеризует поведение, является двигательная активность. Для ее описания используются акселерометры, регистрирующие ускорение в трех перпендикулярных направлениях. Последние два десятилетия их все чаще применяют в исследованиях поведения морских млекопитающих (китообразных и ластоногих), в частности пищевого поведения [3], реакции на антропогенный шум [4], состояния покоя и сна [5, 6]. Белуха – один из наиболее популярных объектов исследований среди китообразных, в том числе как индикатор состояния арктических экосистем [7]. В природных условиях для изучения поведения этого вида использовали регистраторы глубины погружений

и акустической активности, спутниковые метки [7], а в условиях аквариумов и вольерного содержания – методы видеорегистрации [8, 9]. Акселерометрию при исследовании белух применяли крайне редко [10].

Задача данного исследования состояла в том, чтобы оценить возможность описания поведения белух по параметрам их двигательной активности.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на белухе (*Delphinapterus leucas*) на Утришской морской станции Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. На момент проведения экспериментов белуха (самец, возраст не менее 10 лет, вес не менее 600 кг) содержалась на станции три года. За три недели до начала эксперимента животное было помещено в круглый бассейн диаметром 6 м и глубиной 1.8 м. На хвостовой стебель белухи установили мягкий обруч с акселерометром (X16-mini, www.gcdatasconcepts.com, вес 30 г), который регистрировал ускорение в трех направлениях: росто-каудальном, дорзо-вентральном и проксимально-дистальном (рис. 1). Вес обруча составлял 500 г (<0.08% массы белухи) и, судя по

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Калифорнийский университет в г. Лос-Анджелес, Лос-Анджелес, США

\*e-mail: oilyamin@yahoo.com

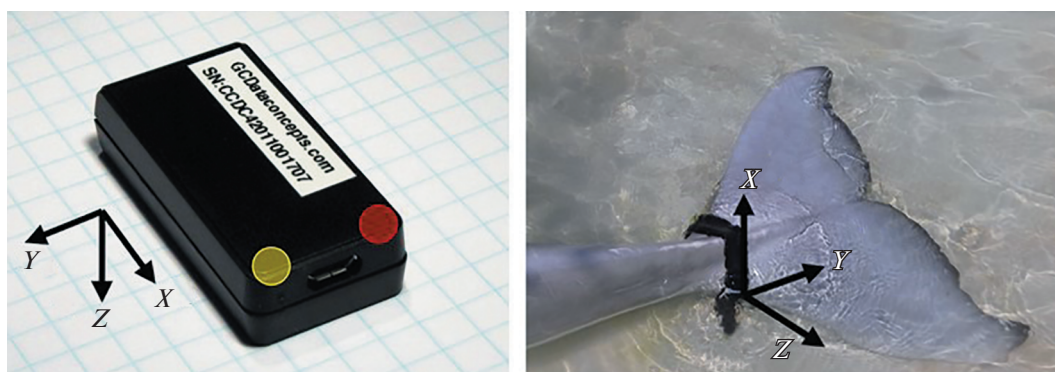


Рис. 1. Акселерометр и его расположение на хвостовом стебле белухи.

поведению, не беспокоил животное. Белуху кормили два раза в день.

Эксперимент продолжался 4 дня, в течение которых поведение белухи регистрировали круглосуточно двумя видеокамерами параллельно с двигательной активностью. В поведении визуально выделяли спокойное зависание у поверхности воды (СЗП) и несколько видов активного поведения, включая плавание по бассейну (АП), игру в струе воды при заливе бассейна, а также активность на месте.

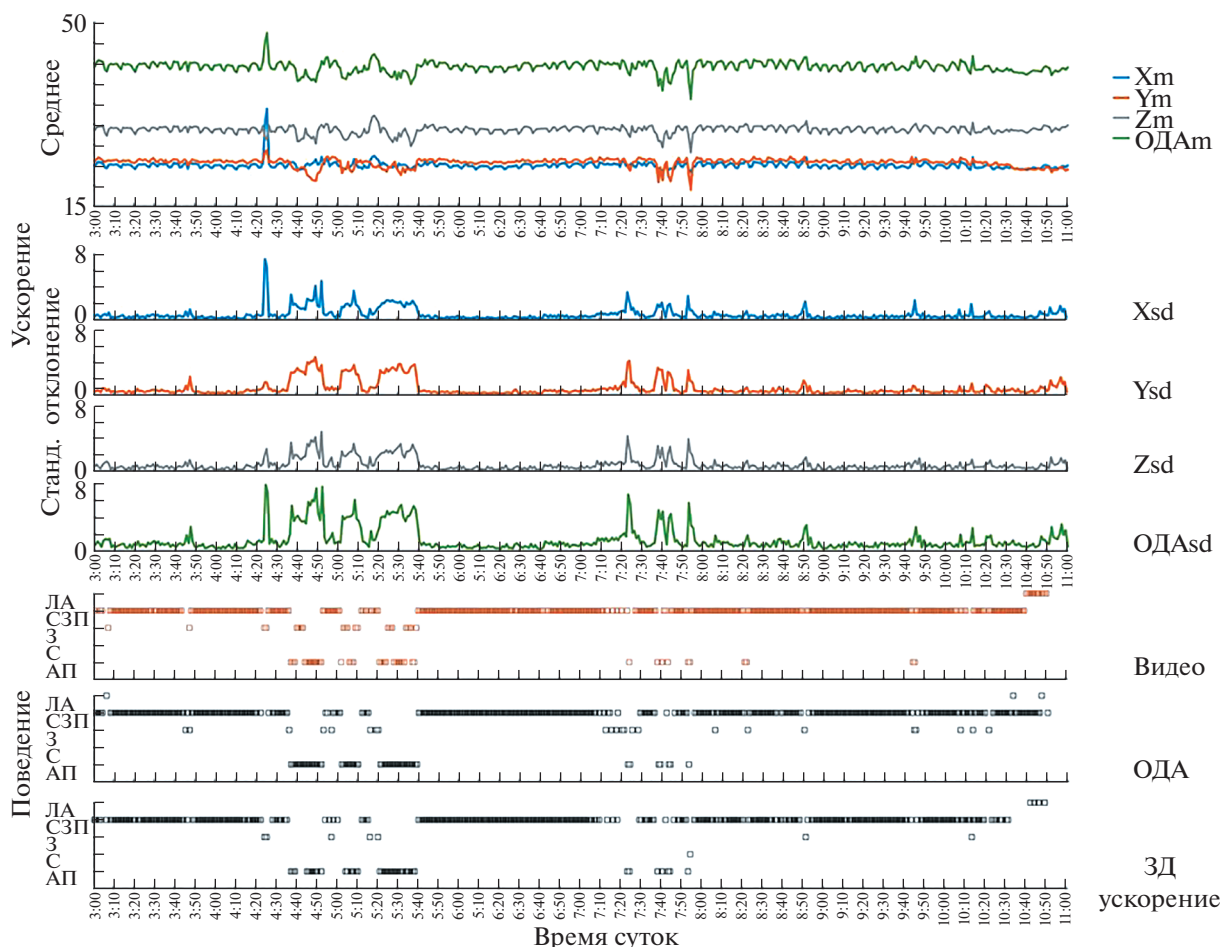
Для установления корреляции между визуально определенным типом поведения и параметрами ускорения были использованы видеозаписи и данные акселерометрии третьего дня. Ускорение по каждой из трех осей оцифровывали с частотой 5 гц. За каждый минутный интервал рассчитывали среднее и стандартное отклонение ускорения по каждой из осей (3Д-ускорение), а также результирующее ускорение – корень из суммы квадратов по всем трем осям (общая двигательная активность, ОДА). Корреляцию между типами поведения и параметрами ускорения устанавливали программными средствами библиотеки “gart” языка программирования R. Процедура реализует метод “дерево решений”, последовательно разбивая данные на группы и добиваясь минимальной суммы квадратов внутригрупповых отклонений [11]. Эффективность классификации оценивали для всех четырех дней (10 ч в день: 2 ч подряд с разрывом в 2 ч; периоды тренировки и смены воды не учитывали) по четырем параметрам, которые применяются для оценки работы систем искусственного интеллекта, а именно: точность (способность определять события данного типа и показатель ложных срабатываний), полнота (показатель пропуска событий и совпадения с экспертной оценкой), специфичность (показатель точности определения событий другого класса), а также по среднему значению для всех трех параметров [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поведение белухи было представлено преимущественно СЗП, на которое приходилось  $83.0 \pm 2.5\%$  ( $n = 4$ ) времени. Суммарная длительность активного поведения составляла  $8.4 \pm 1.9\%$  времени. Значительная его часть представляла собой активное плавание по бассейну (АП). В остальное время белуха дрейфовала у поверхности или заныривала на месте.

На рис. 2 показана динамика ускорения белухи в течение 7 ч параллельно с визуально определенными типами поведения. В СЗП двигательная активность варьировала от повторяющихся движений хвостового стебля до практически полной неподвижности. Ускорение (по всем трем осям) и ОДА регулярно увеличивались и уменьшались с периодом 4–8 мин, что соответствовало характерному для белух чередованию задержек дыхания (белуха опускала голову под воду) и регулярных вдохов-выдохов (белуха поднимала дыхало над водой для каждого вдоха); вариабельность ускорения в это время была низкой. Такой паттерн активности регистрировали до 10:20, когда в бассейне начинался слив (смена) воды. В СЗП выделялись два эпизода с минимальным ускорением и стандартным отклонением (03:50–04:10 и 05:50–06:40); параллельно снижались те же параметры ОДА. Такие эпизоды могли быть глубоким сном [13]. Таким образом, акселерометрия позволяет идентифицировать у белухи периоды покоя с разным уровнем двигательной активности и оценить продолжительность задержек дыхания.

АП регистрировалось в периоды 04:20–05:40 и 07:20–08:00 (рис. 2). АП характеризовалось большим ускорением и большой его вариабельностью по всем трем осям. Параллельно увеличивались ОДА и его вариабельность. Несколько эпизодов занываний совпали с “взрывным” ростом ускорения только по вертикальной оси (например, в 04:30). Это означает, что и другие типы активного поведения белух могут быть выделены по 3Д-ускорению.



**Рис. 2.** Динамика параметров ускорения и типы поведения у белухи. Ускорение – средние значения ( $X_m$ ,  $Y_m$ ,  $Z_m$ ) и стандартное отклонение ( $X_{sd}$ ,  $Y_{sd}$ ,  $Z_{sd}$ ) по трем осям и результирующие значения ( $OДА_m$  и  $OДА_{sd}$ ;  $m/c^2$ , относительные величины). Типы поведения определялись визуально (Видео) и классификатором по 3Д-ускорению и ОДА. Все параметры рассчитаны для одноминутных интервалов. АП – активное плавание, С – активность во время залива бассейна, З – занывивание, СЗП – спокойное зависание у поверхности, ЛА – активность во время слива воды.

По трехкомпонентной оценке (точность, полнота и специфичность), общая эффективность классификации СЗП по 3Д-ускорению и ОДА была одинаковой – в среднем 90% (табл. 1). При этом показатель точности определения СЗП составил 97% (ложных срабатываний всего 3%), полноты – по 3Д-ускорению 89%, по ОДА 94% (пропусков меньше 11%), а специфичность была выше 80% (способность определять поведение, которое не было СЗП). Точность оценки реального количества СЗП по ОДА достигла 98% всего СЗП, определенного визуально, что было даже больше, чем по 3Д-ускорению (92%;  $p = 0.003$ , парный Т-тест).

Некоторые из использованных параметров оценки зависят от числа событий [12]. Тем не менее значимой корреляции между количеством СЗП в разных сутках (79–89% времени регистрации) и метриками оценки не было ( $p > 0.05$ , коэффициент корреляции Пирсона). Таким образом,

эпизоды СЗП у белух могут быть достаточно надежно определены как по 3Д-ускорению, так и ОДА.

АП у белухи определялось хуже, чем СЗП: в среднем на 7–10% (табл. 1). Главным образом это было связано с уменьшением точности (ростом числа ложных срабатываний на 34% для 3Д-ускорения и на 46% для ОДА). Способность классификатора определять общее количество АП также ухудшилась: по 3Д-ускорению превышение реального количества АП составило 46%, а по ОДА – 80%. В то же время специфичность классификации АП по сравнению с СЗП увеличилась примерно на 15%.

В наших условиях количество АП у белухи было в среднем в 20 раз меньше, чем СЗП, а межсубъектные различия составляли 7 раз. Мы не исключаем, что точность определения АП была бы выше при большей продолжительности АП, например, если бы белуха находилась в более

**Таблица 1.** Результаты классификации двух категорий поведения белухи (спокойного зависания у поверхности воды и активного плавания) визуально и по параметрам ускорения и метрики оценки эффективности классификации

Параметр	Спокойное зависание у поверхности (СЗП)		Активное плавание (АП)	
	ЗД	ОДА	ЗД	ОДА
Визуальная оценка	3.5 ± 1.3		—	
Классификатор	77.0 ± 3.0	81.7 ± 2.7 *	4.2 ± 1.3	5.5 ± 1.9
Классификатор/Визуально	92.1 ± 1.7	97.8 ± 1.5 *	131.2 ± 17.1	160.5 ± 5.2
Точность/precision (Т)	96.8 ± 0.9	96.1 ± 1.0	66.3 ± 5.3	53.6 ± 1.5
Полнота/recall (П)	89.1 ± 1.3	94.0 ± 0.9*	84.7 ± 6.7	85.8 ± 2.4
Специфичность/specificity (С)	84.5 ± 4.9	80.5 ± 6.1	98.5 ± 0.5	97.4 ± 0.8
Общая оценка (ТПС/3)	90.1 ± 1.7	90.2 ± 2.2	83.1 ± 2.6	78.9 ± 0.9

Данные представлены как среднее и ошибка измерений для 4 дней. Расчеты сделаны для ЗД-ускорения и ОДА. \* – значимость отличий между средними не менее 0.01 (парный Т-тест). Формулы расчета параметров оценки: Т = ИП/(ИП + ЛП), П = = ИП/(ИП + ЛО), С = ИО/(ИО+ЛП), С = (Т + П + С)/3. ИП – истинно положительный результат, ИО – истинно отрицательный, ЛП – ложно положительный, ЛО – ложно отрицательный.

просторном бассейне или в открытом море, и где она была бы более активна. В то же время значимая корреляция была обнаружена только между количеством АП и значением параметра специфичности ( $R_{xy} = -0.988$ ,  $p = 0.01$ ) при оценке по ОДА.

Таким образом, мы установили, что, используя алгоритм “дерева решений”, эпизоды СЗП у белухи могут быть определены как по параметрам ЗД-ускорения, так и ОДА (что упрощает расчеты) с надежностью 81–97% в зависимости от параметра оценки. СЗП – один из основных типов поведения китообразных, продолжительность которого характеризует скорость метаболизма, уровня стресса и состояния здоровья животного [14]. Для описания поведения животных предсказательная точность классификатора более 90% считается высокой [4, 15]. В то же время выявление у белухи АП было менее точным (56–98%), а оценка суммарной длительности – завышенной. Такие результаты могли определяться достаточно “простыми” параметрами оценки двигательной активности (среднее и стандартное отклонение ускорения) и небольшим количеством АП. Немаловажно, что в нашем эксперименте была использована и простая модель акселерометра. Будущие исследования должны быть направлены на оптимизацию алгоритмов классификации, включая использование других параметров движения (например, доминирующей частоты в ускорении), сокращение интервала анализа (от 1 мин до 10–20 с), а также применение более чувствительных акселерометров.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены при поддержке Русского географического общества.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Whitford M., Klimley A.P. // Anim. Biotelemetry. 2019. V. 7. P. 1–26.
2. Wilmers C.C., Nickel B., Bryce C.M. et al. // Ecology. 2015. V. 96. № 7. P. 1741–1753.
3. Tennessen J.B., Holt M., Hanson M.B. et al. // J. Exp. Biol. 2019. V. 222 (3). jeb191874.
4. Holt M.M., Tennessen J.B., Hanson M.B. et al. // Marine Envir. Research. 2021. V. 170. № 105429.
5. Miller P.J.O., Aoki K., Rendell L.E. et al. // Current Biology. 2008. V. 18. № 1. P. R21–R23.
6. Mitani Y., Andrews R.D., Sato K. et al. // Biol. Lett. 2010. V. 6. № 2. P. 163–166.
7. O’Corry-Crowe G. In. Encyclopedia of Marine Mammals. 2009. P. 108–111.
8. Lyamin O.I., Shpak O.V., Nazarenko E.A. et al. // Physiol. Behav. 2002. V. 76. № 2. P. 265–270.
9. Lyamin O.I., Ostras D.A., Mukhametov L.M. et al. // Proceedings of Meetings on Acoustics. 2016. V. 27. № 050002.
10. Castellote M., Mooney A., Andrews R. et al. // PLoS ONE. 2021. V. 16. № 11. e0260485.
11. James G., Witten D., Hastie T. et al. An Introduction to Statistical Learning with Applications in R. Springer Science. New York. 2013. P. 426.
12. Hossin M., Sulaiman M.N. // Intern. J. Data Mining & Knowledge Management Process. 2015. V. 5. № 2 (1).
13. Lyamin O.I., Manger P.R., Ridgway S.H. et al. // Neurosci. Biobehav. Review. 2008. V. 32. № 8. P. 1451–1484.
14. Qasem L., Cardew A., Wilson A. et al. // PLoS ONE. 2012. V. 7. e31187.
15. Graf P.M., Wilson R.P., Qasem L. et al. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8: e0136751.

## EVALUATION OF AN INSTRUMENTAL METHOD OF CHARACTERIZATION OF BELUGA (*DELPHINAPTERUS LEUCAS*) BEHAVIORS BASED ON THE PARAMETERS OF ACCELERATION

O. I. Lyamin<sup>a,b,#</sup>, E. A. Nazarenko<sup>a</sup>, and Academician of the RAS V. V. Rozhnov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *University of California in Los Angeles, Los Angeles, USA*

<sup>#</sup>*e-mail: oilyamin@yahoo.com*

A non-invasive instrumental method of describing the behavior of the beluga whale (*Delphinapterus leucas*) based on the parameters of movement was evaluated. Motor activity was characterized by the mean and standard deviation of the beluga's tail fluke acceleration. It has been found that using the "decision tree" algorithm, at least two types of beluga behaviors can be distinguished, which are resting at the surface and active swimming in the pool. The determination accuracy (depending on the parameter) was on average 81–97% for resting at the surface, and 54–99% for active swimming behaviors. Differences between the accuracy of classification of resting at the surface based on three axis and overall body acceleration were minimal. In the future, the accuracy may be improved by using other parameters of acceleration, shortening the interval of analysis, and optimizing the classification algorithms.

*Keywords:* behavior, accelerometry, classification, algorithm, decision tree, beluga, *Delphinapterus leucas*, marine mammals

УДК 578.7 : 615.281.8 : 541.64

## СИНТЕЗ И ПРОТИВОГРИППОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ (СО)ПОЛИМЕРОВ ВИНИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2022 г. В. В. Зарубаев<sup>1</sup>, Е. В. Бучков<sup>2</sup>, О. В. Назарова<sup>3</sup>, Ю. И. Золотова<sup>3,\*</sup>,  
член-корреспондент РАН Е. Ф. Панарин<sup>3</sup>

Поступило 15.06.2022 г.

После доработки 08.07.2022 г.

Принято к публикации 08.07.2022 г.

Синтезированы новые сополимеры винилфосфоновой кислоты (ВФК) с 2-дезоксид-2-метакриламидо-D-глюкозой, 4-акрилоилморфолином (4-АМ) и акриламидом, изучена их противовирусная активность в отношении вируса гриппа в опытах *in vitro* и *in vivo*. Оптимальными противовирусными характеристиками и низкой цитотоксичностью обладал сополимер ВФК с 4-АМ состава 56:44 мол. %, молекулярной массой 33000. Полимер проявлял вирусингибирующие свойства с  $IC_{50} = 1$  мкг/мл и индексом селективности 302. Профилактическое интраназальное применение полимера на модели гриппозной пневмонии у мышей полностью предотвращало специфическую смертность при гибели 90% животных в группе плацебо. Полученные результаты свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале полимерных соединений на основе ВФК.

**Ключевые слова:** фосфорсодержащие полимеры, винилфосфоновая кислота, сополимеры, грипп, противовирусные соединения

**DOI:** 10.31857/S2686738922050328

Грипп, несмотря на очевидные успехи в области вакцинологии и химиотерапии, продолжает оставаться трудно контролируемой инфекцией. Это обусловлено особенностями самого возбудителя, в первую очередь, высокой скоростью эволюции, что приводит к ускользанию от иммунного ответа и формированию лекарственно-устойчивых мутантов [1]. Поэтому наряду со средствами специфической терапии применяются патогенетические препараты, направленные на подавление реактивных процессов, таких как цитокиновый шторм, воспалительная инфильтрация тканей органов-мишеней и пр. [2]. В этой связи поиск новых противовирусных лекарственных средств, в особенности неспецифических и эффективных в отношении вирусов разных антигенных групп, является приоритетной задачей медицинской науки.

Полимерные синтетические соединения проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе в отношении самых разных групп

вирусов. Так, активность сульфатированных полисахаридов из морских водорослей, таких как галактансульфат, сульфатированный ксиломаннан, каррагенан и пр., была показана в отношении аденовируса, вируса гриппа, респираторно-синцитиального вируса, коронавируса и пр. [3]. Фосфат-содержащие полимеры синтезируются в клетках и являются одним из факторов противовирусной защиты, в частности, против вируса SARS-CoV-2 [4]. Сходную активность проявляют и синтетические полифосфаты против коронавируса [5, 6] и в отношении ВИЧ [7, 8].

Целью настоящего исследования были синтез новых синтетических полимеров на основе винилфосфоновой кислоты (ВФК) и оценка их противовирусной активности в отношении вируса гриппа в экспериментах на клеточной культуре и на модели гриппозной пневмонии у лабораторных животных.

Гомополимер ВФК и сополимеры с 2-дезоксид-2-метакриламидо-D-глюкозой (МАГ), 4-акрилоилморфолином (4-АМ), акриламидом (АА) получили методом свободно-радикальной (со)полимеризации в запаянных стеклянных ампулах в атмосфере аргона в течение 24 ч. При проведении процесса в *N,N*-диметилформамиде (ДМФА) или метаноле в качестве инициатора использовали 2,2'-азобис-изобутиронитрил (ДАК), в водных растворах — 2,2'-азобис-(2-метилпропионами-

<sup>1</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУН Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: incorporate@inbox.ru



**Таблица 1.** Условия синтеза и характеристики (со)полимеров ВФК (M<sub>1</sub>)

N	Условия (со)полимеризации					Характеристики сополимеров			
	[M <sub>2</sub> ]	[M <sub>1</sub> ]: [M <sub>2</sub> ], мол. %	[M <sub>1</sub> +M <sub>2</sub> ], мас. %	Растворитель	I	[I], мас. % от [M <sub>1</sub> + M <sub>2</sub> ]	Выход, %	[M <sub>1</sub> ], мол. %	M <sub>SD</sub> × 10 <sup>-3</sup>
1*	—	100:0	80	H <sub>2</sub> O	АМП	1	54	100	30
2	МАГ	50:50	10	ДМФА	ДАК	2	71	12	20
3	МАГ	90:10	10	H <sub>2</sub> O	АМП	2	29	53	5
4	4-АМ	25:75	20	метанол	ДАК	2	76	13	77
5	4-АМ	25:75	20	H <sub>2</sub> O	АМП	2	82	14	310
6	4-АМ	50:50	20	H <sub>2</sub> O	АМП	1	38	56	33
7	АА	25:75	20	ДМФА	ДАК	2	93	28	25

24 ч, 60°C.

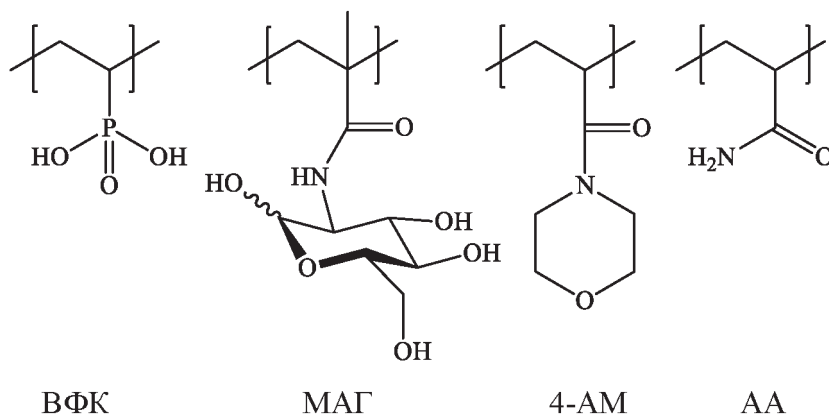
I – инициатор.

\* 80°C.

дин) дигидрохлорид (АМП). Полимеры очищали диализом против воды и выделяли методом лиофильной сушки.

Состав и структуру сополимеров устанавливали с помощью <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопии в растворе D<sub>2</sub>O на спектрометре Bruker Avance 400 (Германия). В <sup>1</sup>H спектрах всех синтезированных сополимеров присутствовали сигналы обоих со-

мономеров, а в <sup>31</sup>P спектрах – сигнал ВФК. Для определения состава сополимеров в качестве внешнего стандарта использовали 2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолин, как описано в статье [9]. Молекулярные массы (M<sub>SD</sub>) определяли методом седиментации и диффузии. Данные по условиям синтеза и свойствам полученных полимеров приведены в табл. 1.



Оценку цитотоксических и противовирусных свойств полимеров *in vitro* проводили как описано в [10].

В опытах использовали белых беспородных мышей (самки) массой 16–18 г из питомника “Рапполово” (Ленинградская обл.). Дизайн исследования утвержден Этическим Комитетом НИИЭМ им. Пастера (протокол № 7А от 15.02.2021). Навески полимера растворяли в физиологическом растворе и вводили животным (10 животных на группу) однократно интраназально (300 мкг/мл, 30 мкл на животное) за 1 ч до

инфицирования. Животные контрольной группы (плацебо) получали 30 мкл физиологического раствора.

Мышей заражали интраназально под эфирным наркозом вирусом в дозе 5 × 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> на мышь в объеме 30 мкл. Отдельную группу животных инфицировали вирусом в той же дозе, но предварительно инкубированным в течение 1 ч с раствором полимера (300 мкг/мл). Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней. Ежедневно фиксировали гибель животных. Достоверность различий в гибели животных оцени-

**Таблица 2.** Цитотоксичность и противовирусная активность фосфорсодержащих полимеров в отношении вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) в культуре клеток MDCK

№	$M_{SD}, \times 10^{-3}$	$CC_{50}, \text{мкг/мл}$	$IC_{50}, \text{мкг/мл}$	SI
1 (ВФК/100)	30	>330	$1.3 \pm 0.2$	254
2 (ВФК: МАГ/12:88)	20	>330	$280.0 \pm 36.0$	1.2
3 (ВФК: МАГ/53:47)	5	>330	$15.5 \pm 2.3$	21.2
4 (ВФК: 4-АМ/13:87)	77	$30.0 \pm 2$	>30	<1
5 (ВФК: 4-АМ/14:86)	310	>330	$356.0 \pm 44.0$	<1
6 (ВФК: 4-АМ/56:44)	33	$302.0 \pm 15.0$	$1.0 \pm 0.2$	302
7 (ВФК: АА/28:72)	25	$84.0 \pm 6.0$	$72.0 \pm 10.1$	1.2

**Таблица 3.** Активность фосфорсодержащего полимера 6 на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей

Группа опыта	Показатели смертности в группе			
	Погибших животных (пало/заражено)	Смертность, %	ИЗ	<i>p</i>
Плацебо	9/10	90	–	1.0000
6 и/н	0/10	0	100	<0.0001
Инкубированный вирус*	9/10	90	0	0.6813

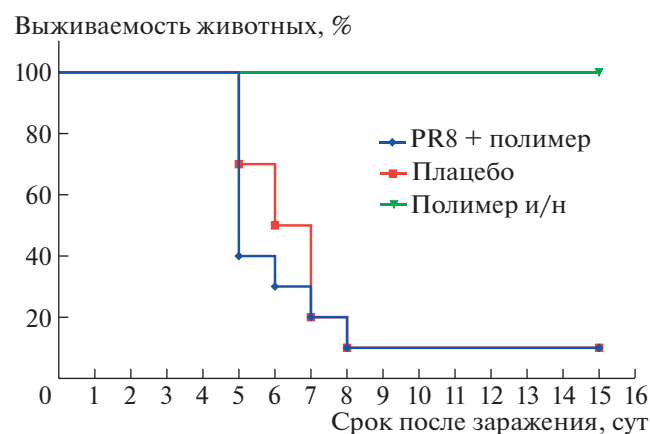
ИЗ – индекс защиты.

*p* – критерий Мантела–Кокса для попарных сравнений с группой плацебо.

и/н – интраназальное введение 6 за 1 ч до инфицирования вирусом.

\* – животные заражены вирусом, предварительно инкубированным с 6.

вали при помощи критерия Мантела–Кокса при анализе кривых выживаемости Каплана–Мейера пакета программ GraphPad Prism v.6.01. Достоверными считали различия между группами, если параметр *p* не превышал 0.05.



**Рис. 1.** Кривые выживаемости Каплана–Мейера в ходе гриппозной пневмонии у мышей, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico (H1N1) в условиях применения фосфорсодержащего полимера 6. PR8+ полимер – животные заражены вирусом, предварительно инкубированным с полимером (300 мкг/мл) в течение 1 ч. Плацебо – животные получали интраназально физиологический раствор. Полимер и/н – животные получали интраназально раствор 6.

Результаты изучения противовирусной активности и цитотоксичности фосфорсодержащих полимеров *in vitro* суммированы в табл. 2.

Из проанализированных максимальную активность ( $SI = 302$ ) имело соединение 6. На биологические свойства полимеров влияли их химический состав и молекулярный вес. Так, токсичность полимеров 4 и 5, имеющих практически идентичное соотношение мономеров ВФК и 4-АМ, различалась более чем на порядок, при этом большую токсичность имел полимер меньшего молекулярного веса.

Результаты изучения динамики гибели животных суммированы в табл. 3 и представлены на рис. 1.

Заражение животных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) приводило к их гибели, начиная с 5-х суток после инфицирования. К 14-м суткам эксперимента смертность животных в группе положительного контроля составила 90%. Предварительная инкубация вируса с изучаемым полимером не снижала показатели смертности животных ( $p = 0.6813$ ), тогда как предварительная интраназальная обработка мышей раствором полимера приводила к 100% их защите от летальной гриппозной инфекции ( $p < 0.0001$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен синтез и изучены свойства сополимеров винилфосфоновой кислоты (ВФК) с 2-деокси-2-метакриламидо-D-глюкозой, акриламидом и 4-акрилоилморфолином (4-АМ) как потенциальных средств ингибирования инфекционной активности вируса гриппа. Показано, что оптимальными противовирусными характеристиками обладает сополимер ВФК с 4-АМ в соотношении 56:44 молекулярной массой 33000. Полимер обладал низкой цитотоксичностью, проявлял вирусингибирующие свойства с  $IC_{50} = 1$  мкг/мл и индексом селективности 302. Профилактическое интраназальное применение полимера на модели гриппозной пневмонии у мышей полностью предотвращало специфическую смертность при гибели 90% животных в группе плацебо. Ранее проведенные исследования свидетельствуют также о способности фосфорсодержащих полимеров к активации неспецифической противовирусной защиты организма [11], что может обуславливать комплексный механизм борьбы с гриппозной инфекцией при использовании полимеров изученного состава. Полученные результаты свидетельствуют о высоком противовирусном потенциале полимерных соединений на основе винилфосфоновой кислоты.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2020-794).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lampejo T. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2020. V. 39. № 7. P. 1201–1208.
2. Chow E.J., Doyle J.D., Uyeki T.M. // Crit Care. 2019. V. 23. № 1. P. 214.
3. Jabeen M., Dutot M., Fagon R., Verrier B., Monge C. // Pharmaceutics. 2021. V. 13. № 5. P. 733.
4. Schepler H., Wang X., Neufurth M., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. // Theranostics. 2021. V. 11. № 13. P. 6193–6213. <https://doi.org/10.7150/thno.59535>
5. Neufurth M., Wang X., Tolba E., Lieberwirth I., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. // Biochem Pharmacol. 2020. V. 182. P. 114215.
6. Müller W.E.G., Neufurth M., Wang S., Tan R., Schröder H.C., Wang X. // Mar. Drugs. 2020. V. 18. № 12. P. 639.
7. Yang S., Pannecouque C., Herdewijn P. // Chem Biodivers. 2012. V. 9. № 10. P. 2186–2194.
8. Pérez-Anes A., Stefaniu C., Moog C., Majoral J.P., Blanzat M., Turrin C.O., Caminade A.M., Rico-Lattes I. // Bioorg. Med. Chem. 2010. V. 18. № 1. P. 242–248.
9. Nazarova O., Chesnokova E., Nekrasova T., Zolotova Yu., Dobrodumov A., Vlasova E., Fisher A., Bezrukova M., Panarin E. // Polymers. 2022. V. 14. № 3. P. 590.
10. Smirnova I., Petrova A., Lobov A., Minnibaeva E., Phoung T.T.T., Van L.T., Khine M.M., Esaulkova I., Slita A., Zarubaev V., Kazakova O. The Journal of Antibiotics. 2022. V. 75. № 5. P. 258–267.
11. Neufurth M., Wang X., Wang S., Schröder H.C., Müller W.E.G. // Mar. Drugs. 2021. V. 19. № 2. P. 64.

## SYNTHESIS AND ANTI-INFLUENZA ACTIVITY OF VINYLPHOSPHONIC ACID (CO)POLYMERS

V. V. Zarubaev<sup>a</sup>, E. V. Buchkov<sup>b</sup>, O. V. Nazarova<sup>c</sup>, Yu. I. Zolotova<sup>c, #</sup>,  
and Corresponding Member of the RAS E. F. Panarin<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences (IMC RAS), Saint Petersburg, Russian Federation

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

New copolymers of vinylphosphonic acid (VPA) with 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose, 4-acryloylmorpholine (4-AM), and acrylamide have been synthesized, and their antiviral activity against influenza virus has been studied in *in vitro* and *in vivo* experiments. Optimal antiviral characteristics and low cytotoxicity were exhibited by the copolymer of VPA with 4-AM, composition 56: 44 mol.%, molecular weight 33000. The polymer revealed virus-inhibiting properties with an  $IC_{50} = 1$   $\mu$ g/mL and a selectivity index of 302. Prophylactic intranasal application of the polymer in a murine model of influenza pneumonia completely prevented virus-induced death of animals; the level of mortality in the placebo group being 90%. The results obtained indicate a high antiviral potential of polymeric compounds based on VPA.

**Keywords:** phosphorus-containing polymers, vinyl phosphonic acid, copolymers, influenza, antiviral compounds

УДК 569.423:551.793(477.75)

**РАННЕПЛЕЙСТОЦЕНОВЫЙ ПОДКОВОНОС  
RHINOLOPHUS MACRORHINUS CIMMERIUS SUBSP. NOV.  
(RHINOLOPHIDAE, CHIROPTERA) ИЗ ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА В КРЫМУ**

© 2022 г. Академик РАН А. В. Лопатин<sup>1,\*</sup>

Поступило 15.05.2022 г.

После доработки 27.05.2022 г.

Принято к публикации 01.06.2022 г.

Из нижнеплейстоценовых отложений пещеры Таврида в центральном Крыму описаны многочисленные остатки (неполный череп, черепные и нижнечелюстные фрагменты, изолированные зубы) крупного подковоноса из группы *Rhinolophus ferrumequinum*, отнесенного к новому подвиду *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* subsp. nov. По зубным признакам новый подвид менее специализирован, чем *R. m. anomalidens* Topál, 1979 из позднего виллафранка Центральной Европы, что подразумевает его происхождение от более древней формы, морфологически близкой *R. m. macrorhinus* Topál, 1963. Хорошая сохранность черепных структур позволила изучить следы небных валиков и строение носовых раковин *R. macrorhinus cimmerius* subsp. nov.

*Ключевые слова:* *Rhinolophus macrorhinus*, Rhinolophidae, Chiroptera, ранний плейстоцен, Крым, пещера Таврида, небные валики, носовые раковины

DOI: 10.31857/S2686738922050171

Раннеплейстоценовые мелкие млекопитающие из пещеры Таврида в центральном Крыму (Белогорский район, пос. Зуя) включают насекомоядных, зайцеобразных, грызунов [1, 2] и рукокрылых. Наиболее многочисленны остатки Rodentia и Chiroptera. Проведенное нами предварительное изучение показало присутствие в составе ассоциации летучих мышей из этого местонахождения представителей родов *Rhinolophus* (Rhinolophidae), *Eptesicus*, *Plecotus* и *Myotis* (Vespertilionidae).

В настоящей статье описываются черепные, нижнечелюстные и зубные остатки крупных подковоносов *Rhinolophus macrorhinus* Topál, 1963 из нижнеплейстоценовых отложений пещеры Таврида, собранные в 2018, 2020 и 2021 г. Хорошая сохранность черепных материалов позволила изучить следы небных валиков и строение носовых раковин; обычно эти структуры не попадают в область внимания исследователей ископаемых рукокрылых.

Возраст фаунистического комплекса пещеры Таврида определен в пределах позднего виллафранка, около 1.8–1.5 млн л.н. [1, 2].

Изученный материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в г. Москве. Размеры приведены в мм. Методика измерений черепа по [3]. Терминология строения зубов по [4]. О составе и эволюции группы *Rhinolophus ferrumequinum* в плейстоцене Европы см. [5–8].

Отряд Chiroptera Blumenbach, 1779

Семейство Rhinolophidae Gray, 1825

Подсемейство Rhinolophinae Gray, 1825

Род *Rhinolophus* Lacépède, 1799*Rhinolophus macrorhinus* Topál, 1963*Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, subsp. nov.

Название подвида — лат. киммерийский, от Киммерии, античного названия Крыма и всего Северного Причерноморья.

Г о л о т и п — ПИН, № 5644/940, неполный череп с правыми и левыми С<sup>1</sup>, Р<sup>4</sup>–М<sup>3</sup> (рис. 1а–1г, 4а); Россия, Республика Крым, Белогорский район, местонахождение Таврида (точка “Логово гиен”, шурф 3, глубина 130–140 см; сборы 2020 г.); нижний плейстоцен.

О п и с а н и е (рис. 1–4). Размеры сравнительно крупные, как у современного *R. ferrumequinum* (Schreber, 1774). Череп относительно низкий, мозговая коробка широкая, отчетливо выпуклая латерально. Межглазничный промежуток узкий. Ширина черепа в скуловых дугах немного пре-

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

\*e-mail: alop@paleo.ru



**Рис. 1.** *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, subsp. nov.: а–г – голотип ПИН, № 5644/940, неполный череп с правыми и левыми  $C^1$ ,  $P^4-M^3$ : а – с дорсальной стороны, б – с вентральной стороны, в – с правой латеральной стороны, г – с ростральной стороны; д – экз. ПИН, № 5644/936, лицевая часть черепа с правыми и левыми  $C^1$ ,  $P^4-M^3$  с вентральной стороны; е – экз. ПИН, № 5644/803, лицевая часть черепа с левыми  $C^1$ ,  $P^4-M^2$  и правыми  $P^4-M^2$  с вентральной стороны; ж – экз. ПИН, № 5644/801, лицевая часть черепа с правыми  $C^1$ ,  $P^2$ ,  $P^4-M^3$  и левыми  $C^1$ ,  $P^4-M^3$  с вентральной стороны; з – экз. ПИН, № 5644/938, лицевая часть черепа с правыми и левыми  $P^4-M^3$  с вентральной стороны; и – экз. ПИН, № 5644/810, левая верхнечелюстная кость с  $C^1-M^3$  с окклюзиальной стороны; к–м – экз. ПИН, № 5644/822, правая нижнечелюстная кость с  $C^1-M^3$ : к – с лабиальной стороны, л – с окклюзиальной стороны, м – с лингвальной стороны; н–п – экз. ПИН, № 5644/821, правая нижнечелюстная кость с  $C^1-M^3$ : н – с лабиальной стороны, о – с окклюзиальной стороны, п – с лингвальной стороны; р – экз. ПИН, № 5644/851, левая нижнечелюстная кость без зубов с лабиальной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

восходит ширину в мастоидных отростках. Суставные впадины сравнительно небольшие.

Ростральный отдел черепа массивный (рис. 1а, 1б). Клыки широко расставлены. Носовое вздутие умеренно высокое, короткое, спереди не выступает за край носовой вырезки. Парные сре-

динные вздутия хорошо развиты, но слабо обособлены друг от друга, парные боковые вздутия слабо обозначены. Надглазничные гребни четко выражены, ограниченная ими дистально и латерально ростральная (или лобная) впадина (расположенная позади срединных вздутий) уме-

ренно углубленная. Сагиттальный гребень, тянущийся от места слияния надглазничных гребней к затылку, хорошо развит на всем протяжении и особенно высок на уровне передней части мозговой коробки (рис. 1в, 1г).

Подглазничное отверстие крупное, треугольной формы. Костный мостик, отделяющий подглазничное отверстие от глазницы, очень узкий и тонкий, палочковидный. Мелкое щелевидное слезное отверстие находится в дорсальной основе этого костного мостика, на уровне середины  $M^2$ . Скуловая дуга тонкая, низкая, с очень легким дорсальным изгибом (рис. 1в).

Наименьшее расстояние между наиболее выступающим постеролингвальным краем полки гипокона  $M^2$  и задним краем верхнечелюстной кости примерно равняется ширине полки гипокона  $M^2$  или в полтора-два раза превосходит ее.

Небный мостик сравнительно короткий (длина без переднего выступа и заднего шипа составляет 31–36.5% от длины верхнечелюстного зубного ряда  $C^1-M^3$ ), его передний край находится на уровне паракона, протокона или мезостилиа  $M^1$ , а задний край расположен на уровне мезостилиа, метакона или метастилиа  $M^2$  либо парастилиа  $M^3$ . Хоаны заметно расширены постеролатерально.

На некоторых экземплярах в пределах костного неба сохранились следы мягких тканей, позволяющие реконструировать наличие пяти слегка изогнутых дистально поперечных небных складок (или небных валиков, *plcae palatinae transversae vel rugae palatinae*). Эти следы имеют вид легких субпараллельных углублений, часто подчеркнутых осветлениями на поверхности кости в форме широких субпоперечных полос и более четких тонких линий на месте осевых частей небных валиков (экз. ПИН, №№ 5644/801, 803, 806, 816, 937, 938, 954, 956, 959, 963 и голотип).

На экз. ПИН, № 5644/936 остатки оснований небных складок сохранились в виде светлоокрашенного корковидного рыхловатого непрочного образования на костном небе, с шевронообразными поперечными утолщениями по осевым гребням отдельных валиков (рис. 1д, 2а, 2б). Латеральные края наиболее дистального из идентифицированных небных валиков располагаются у полка гипоконов левого и правого  $M^2$ . Более мезиальные небные складки находятся соответственно на уровне середины  $M^2$ , лингвального промежутка  $M^1/M^2$ , середины  $M^1$  и заднего края  $P^4$ . Очевидно, еще два крупных передних небных валика располагались в пределах твердого неба спереди от небного мостика (валик I между клыками, валик II между противоположными  $P^4$  или промежутками  $C^1/P^4$ ), как у других представителей рода *Rhinolophus* [9, 10]. Таким образом, сохранившиеся на экз. ПИН, № 5644/936 следы от-

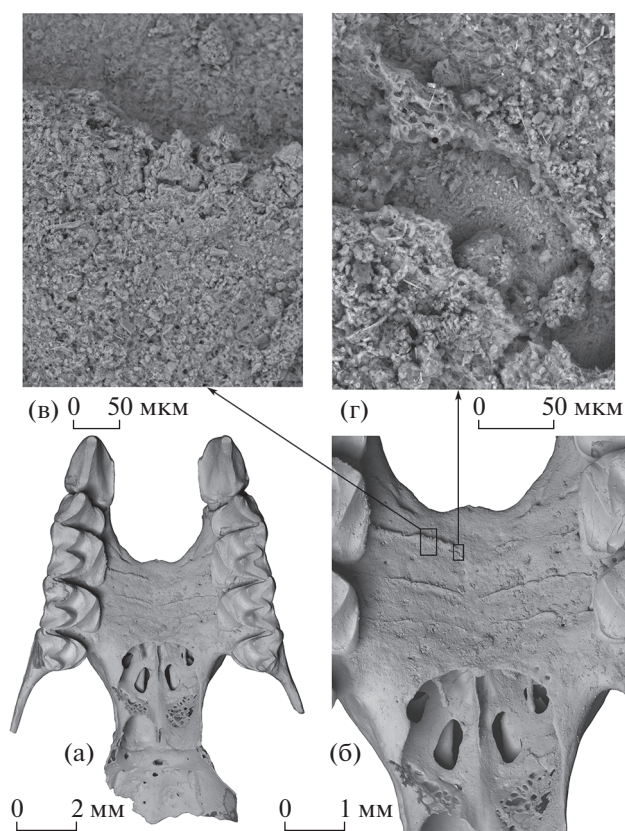
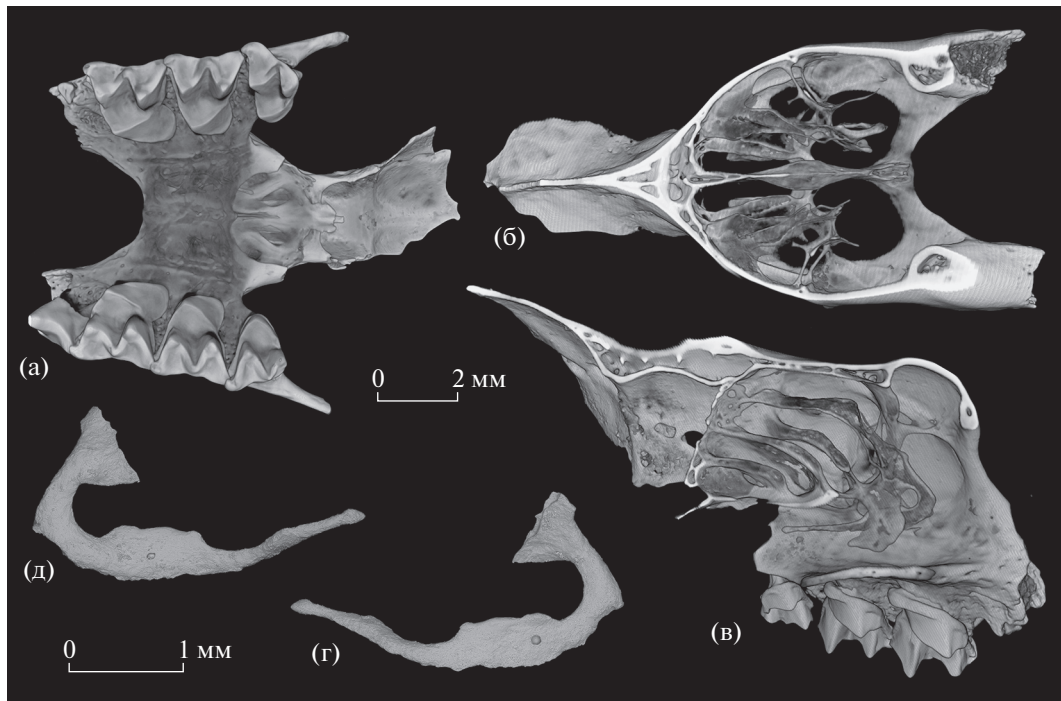


Рис. 2. *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, subsp. nov., экз. ПИН, № 5644/936, лицевая часть черепа с правыми и левыми  $C^1$ ,  $P^4-M^3$  с вентральной стороны (СЭМ): а – общий вид; б – костное небо; в – увеличенный фрагмент правой части небного гребня IV; г – увеличенный фрагмент правой части небного гребня IV в области разрушения (видна поверхность кости); Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

носятся к небным валикам III (между промежутками  $P^4/M^1$ ), IV (между средними частями противоположащих  $M^1$ ), V (между промежутками  $M^1/M^2$ ), VI (между средними частями противоположащих  $M^2$ ) и VII (между полками гипоконов  $M^2$ , у заднего края небного мостика). На экз. ПИН, №№ 5644/803, 816, 938 сохранились следы небных валиков III–VI, на экз. ПИН, № 5644/806 – небных валиков IV–VII, на прочих – только небных валиков V и VI (рис. 1б, 1е–1з).

Изучение корковидных образований, слагающих остатки небных валиков на экз. ПИН, № 5644/936, на сканирующем электронном микроскопе Tescan Vega II ХМУ в ПИН показало их слоисто-комковатую неупорядоченную ячеистую структуру (рис. 2в, 2г). Исследование данного образца методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии на указанном СЭМ (программное обеспечение INCA 4.14, Oxford Instruments) продемонстрировало отсутствие качествен-



**Рис. 3.** *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, subsp. nov., экз. ПИН, № 5644/939, лицевая часть черепа с правыми  $P^4-M^3$  и левыми  $M^1-M^3$ : а – с вентральной стороны; б – томограмма носовой полости, аксиальная проекция (медиальный и латеральный тяжи правого комплекса турбиналий удалены); в – томограмма левой половины носовой полости, сагиттальная проекция (в антеровентральной части комплекса турбиналий видны крупные костные тяжи, более длинный латеральный тяж сильно выступает дистально); г, д – изъятый из носовой полости правый латеральный тяж (СЭМ): г – с латеральной стороны, д – с медиальной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

ных и количественных различий в химическом составе (при преобладании Са, Р и О) между веществом остатков небных валиков и костным веществом других частей черепа. Следует полагать, что описанные остатки небных валиков представляют собой fossilized фрагменты соединительной ткани, слагавшей основания небных валиков при жизни животного [см. 9]. Внешне они соответствуют высохшим морфологическим структурам соединительных тканей твердого неба на черепах современных рукокрылых из остеологических коллекций.

Носовые раковины (турбиналии) внутри носовой полости имеют характерное для *Rhinolophoidea* (и уникальное среди *Mammalia*) строение, связанное с назофонацией (испусканием эхолокационных сигналов через ноздри), свойственной этим летучим мышам [11–13]. В антеровентральной части комплекса турбиналий каждой стороны обособлены два резко изогнутых и вытянутых дистально тонких костных тяжа – медиальный и латеральный (рис. 1г, 3). Более длинный латеральный тяж достигает уровня заднего края небного мостика (экз. ПИН, №№ 5644/801, 803, 937, 954), слегка выступает за него (экз. ПИН, №№ 5644/802, 938, 939; рис. 3а) или заметно вы-

ходит за пределы носовой полости и достигает уровня парастилия – паракона  $M^3$  (голотип; рис. 1б) или даже метакона  $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/936; рис. 1д, 2а, 2б). Средняя часть горизонтальной порции латерального тяжа расширена дорсовентрально и имеет по одному миниатюрному отверстию на латеральной и медиальной сторонах (рис. 3г, 3д). Медиальный тяж существенно короче латерального и не выходит за край небного мостика (рис. 3в).

Ряд  $C^1-P^4$  по длине в 1.5–1.7 раза уступает ряду  $M^1-M^3$  (рис. 1б, 1д, 1ж, 4а, 4б).

Верхний клык  $C^1$  мощный, высокий, трехгранный, с резкими ребрами и слегка загнутой дистально вершиной (рис. 1в, 1г). Основание коронки трапециевидных очертаний. Лингвальная сторона длиннее лабиальной, прямая, с заметным постеролингвальным выступом. Цингулом непрерывный, его высота положения и толщина изменчивы. На антеролабиальной стороне цингулом резко изогнут в апикальном направлении. Постеролабиальный край основания коронки с глубокой вырезкой, в которой помещается коронка  $P^2$ . Постеролингвальная сторона основания коронки слегка вогнутый (рис. 4а, 4б).

Рудиментарный верхний малый премоляр  $P^2$  однокорневой, с округлой плоской коронкой (рис. 1ж, 1и, 4б). Он смещен к лабиальному краю зубного ряда и не препятствует прямому контакту  $C^1$  и  $P^4$  (хотя обычно между этими зубами сохраняется небольшой промежуток).

Верхний большой премоляр  $P^4$  короткий и широкий, с мелким парастилем, развитым талонном и узким цингулюмом, который существенно расширяется в лингвальной части. Цингулюм прерывается в середине задней стороны основания коронки, на месте отчетливой задней вырезки (рис. 4а, 4б).

Верхние моляры  $M^1$  и  $M^2$  с широкой полкой гипокона, особенно мощной и сильно выступающей постеролингвально на  $M^1$  (рис. 1б, 1д–1з, 2а, 4а, 4б). Прецингулюм короткий и узкий, постцингулюм хорошо развитый. Задняя вырезка неглубокая, но отчетливая.  $M^3$  сравнительно слабо редуцированный, субтреугольный, с крупным парастиллярным выступом. Метастиль отсутствует, метакон хорошо развит. Прецингулюм и постцингулюм рудиментарные, короткие и узкие.

Горизонтальная ветвь нижнечелюстной кости относительно длинная и низкая, с вогнутым вентральным краем и хорошо развитым подбородочным выступом (рис. 1к–1р). Подбородочное отверстие округлое, расположено под  $P_2$ , задней частью  $C_1$  или границей  $C_1/P_2$ . Симфиз достигает уровня задней части  $C_1$ . Нижнечелюстное отверстие крупное, овальное, продольно вытянутое. Восходящая ветвь длинная и низкая. Венечный отросток субтреугольный, по высоте приблизительно равен  $C_1$ . Передний и задний края венечного отростка пологие, вершина слегка загнута назад. Сочленовный отросток длинный, суставный мыщелок широкий. Постдентальная длина нижнечелюстной кости (расстояние от  $M_3$  до заднего края суставного мыщелка) приблизительно равна длине ряда  $M_1$ – $M_3$ . Угловой отросток мощный, длинный и сравнительно широкий, с тупым концом, направлен дистолатерально (рис. 1л, 1о).

Альвеолы двух нижних резцов тесно сближенные (рис. 4в).

Длина ряда  $C_1$ – $P_4$  приблизительно в 1.8–1.9 раза меньше длины ряда  $M_1$ – $M_3$  (рис. 4в, 4г).

Нижний клык  $C_1$  высокий, вертикальный. Основание коронки полукруглое, задний край слегка вогнутый. Цингулид непрерывный, узкий, формирует заметный постеролингвальный выступ.

Нижние малые премоляры представлены  $P_2$  и рудиментарным  $P_3$  (рис. 1к, 1л, 1н, 1о, 4в, 4г). В редких случаях  $P_3$  не развит, его альвеола отсутствует (рис. 1р).

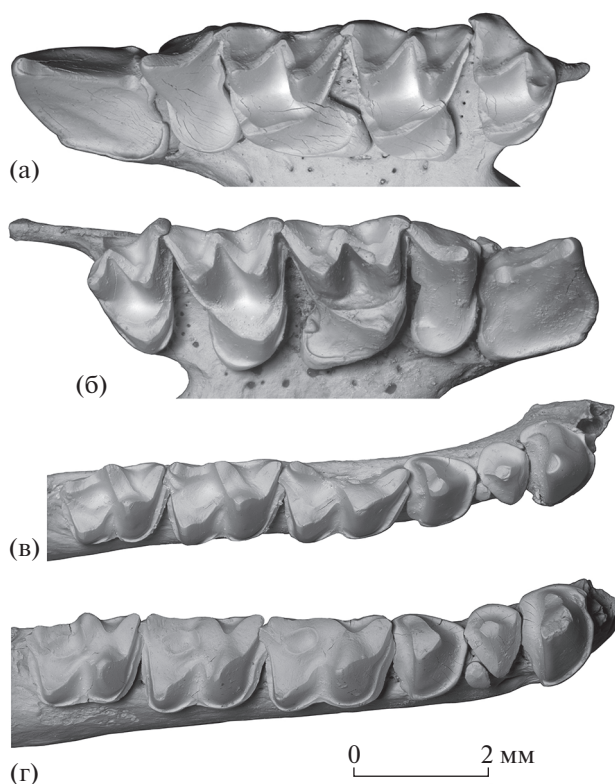


Рис. 4. *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* Lopatin, subsp. nov.: а – голотип ПИН, № 5644/940, левые  $C^1$  и  $P^4$ – $M^3$  с окклюзиальной стороны; б – экз. ПИН, № 5644/801, правые  $C^1$ – $M^3$  с окклюзиальной стороны; в – экз. ПИН, № 5644/822, правые  $C_1$ – $M_3$  с окклюзиальной стороны; г – экз. ПИН, № 5644/821, правые  $C_1$ – $M_3$  с окклюзиальной стороны; Россия, Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

$P_2$  низкий, приблизительно вчетверо ниже  $C_1$ . Коронка короткая и широкая, с округло-треугольной окклюзиальной поверхностью (лингвальная сторона заметно длиннее лабиальной) и узким цингулидом по всему основанию коронки.

$P_3$  очень мелкий, однокорневой, столбиковидный, смещен лабиально от оси зубного ряда и не препятствует контакту  $P_2$  и  $P_4$ . Дистально  $P_3$  прилегает к антеролабиальной стороне коронки  $P_4$ , а антеродорсально частично перекрывается задней частью коронки  $P_2$ . Коронка  $P_3$  овальная, поперечно вытянутая. Этот рудиментарный зуб участвует в окклюзии на поздних онтогенетических стадиях, при очень сильном стирании  $P_2$  (рис. 4г).

Нижний большой премоляр  $P_4$  приблизительно вдвое ниже  $C_1$ , но заметно выше остальных нижних зубов. Коронка  $P_4$  трехгранная, с непрерывным узким цингулидом, слабо утолщенным у дистального края.

Нижние моляры никталодонтного типа, с узким непрерывным лабиальным цингулидом.  $M_1$



**Таблица 1.** Размеры (в мм) черепа и верхних зубов *Rhinolophus macrorhinus* Topál, 1963 (*n* – число экземпляров)

Параметры	<i>R. macrorhinus cimmerius</i> subsp. nov.			<i>R. macrorhinus macrorhinus</i> [5, 6]	<i>R. macrorhinus anomalidens</i> [6]
	<i>n</i>	пределы	среднее	голотип	пределы
Длина небного мостика	22	2.45–3.1	2.68	2.8	2.45–2.95
Высота носовой выпуклости	19	3.9–4.3	4.1	4.7	4.4–4.45
Межглазничная ширина	10	2.4–2.9	2.79	3.2	–
Ширина на уровне С <sup>1</sup> –С <sup>1</sup>	4	6.2–6.7	6.5	6.7	7.1–7.3
Ширина на уровне М <sup>2</sup> –М <sup>2</sup>	10	7.9–8.4	8.13	–	–
Ширина на уровне М <sup>3</sup> –М <sup>3</sup>	6	8.2–8.7	8.45	8.7	8.6–8.75
Длина С <sup>1</sup> –М <sup>3</sup>	6	8.2–8.5	8.37	9.2	8.3–8.85
Длина С <sup>1</sup> –Р <sup>4</sup>	8	3.15–3.4	3.29	3.77	3.68–3.91
Длина Р <sup>2</sup> –М <sup>3</sup>	2	6.65–6.7	6.68	–	6.6–7.0
Длина Р <sup>4</sup> –М <sup>3</sup>	18	6.05–6.5	6.29	6.75	6.15–6.7
Длина М <sup>1</sup> –М <sup>3</sup>	26	4.8–5.4	5.19	5.65	4.68–5.49
Наименьшее расстояние между С <sup>1</sup> и Р <sup>4</sup>	7	0.1–0.15	0.11	–	0.14–0.23
Длина С <sup>1</sup>	28	2.0–2.2	2.11	2.4	2.08–2.45
Ширина С <sup>1</sup>	28	1.6–1.9	1.75	1.8	1.72–2.08
Длина Р <sup>2</sup>	3	0.45–0.55	0.48	–	0.25–0.5
Ширина Р <sup>2</sup>	3	0.4–0.5	0.47	–	0.41–0.59
Длина Р <sup>4</sup>	29	1.2–1.4	1.3	–	1.22–1.5
Ширина Р <sup>4</sup>	28	2.1–2.5	2.31	–	2.13–2.54
Длина М <sup>1</sup>	62	1.9–2.2	2.02	2.24	1.9–2.23
Ширина М <sup>1</sup>	60	2.35–2.65	2.49	3.25	2.72–3.32
Длина М <sup>2</sup>	52	1.8–2.15	1.95	2.16	1.72–2.08
Ширина М <sup>2</sup>	51	2.25–2.6	2.46	2.88	2.41–3.0
Длина М <sup>3</sup>	38	1.35–1.6	1.45	1.44	1.18–1.4
Ширина М <sup>3</sup>	38	2.0–2.25	2.11	2.12	2.03–2.31

немного длиннее М<sub>2</sub>, протокристид на М<sub>1</sub> короче и сильнее скошен назад, чем на М<sub>2</sub>. М<sub>3</sub> немного короче М<sub>2</sub>. На М<sub>3</sub> талонид сравнительно узкий, гипоконулид мельче, чем на М<sub>1</sub> и М<sub>2</sub>.

Размеры в мм представлены в табл. 1, 2.

Голотип ПИН, № 5644/940: длина небного мостика – 2.7; высота носового вздутия (от переднего края небного мостика до вершины) – 4.1; межглазничная ширина (в межглазничном сужении) – 2.6; ширина на уровне С<sup>1</sup>–С<sup>1</sup> – 6.7; ширина на уровне М<sup>2</sup>–М<sup>2</sup> – 8.1; ширина на уровне М<sup>3</sup>–М<sup>3</sup> – 8.5; расстояние от середины сагиттального гребня до латерального выступа правой скуловой дуги – 6.4 (реконструированная ширина черепа в скуловых дугах – около 12.5–12.8); ширина черепа в мастоидных отростках – 11.6; длина С<sup>1</sup>–М<sup>3</sup> – 8.45 (dex – правый, sin – левый); длина С<sup>1</sup>–Р<sup>4</sup> –

3.35 (dex, sin); длина Р<sup>4</sup>–М<sup>3</sup> – 6.3 (dex, sin); длина М<sup>1</sup>–М<sup>3</sup> – 5.2 (dex, sin); наименьшее расстояние между С<sup>1</sup> и Р<sup>4</sup> – 0.1 (dex), 0.15 (sin). Отношение длины небного мостика к длине С<sup>1</sup>–М<sup>3</sup> – 0.32; отношение длины М<sup>1</sup>–М<sup>3</sup> к длине С<sup>1</sup>–Р<sup>4</sup> – 1.55. Размеры зубов (L – длина, W – ширина, H – высота): С<sup>1</sup> (dex): L – 2.1; W – 1.75; H – 3.5; С<sup>1</sup> (sin): L – 2.1; W – 1.8; H – 3.5; Р<sup>4</sup> (dex, sin): L – 1.25, W – 2.35; М<sup>1</sup> (dex): L – 2.0, W – 2.45; М<sup>1</sup> (sin): L – 2.05, W – 2.45; М<sup>2</sup> (dex): L – 1.95, W – 2.4; М<sup>2</sup> (sin): L – 2.0, W – 2.4; М<sup>3</sup> (dex): L – 1.5, W – 2.15; М<sup>3</sup> (sin): L – 1.35, W – 2.15.

Экз. ПИН, № 5644/801: длина небного мостика – 2.7; высота носового вздутия – 3.9; межглазничная ширина – 2.9; ширина на уровне С<sup>1</sup>–С<sup>1</sup> – 6.6; ширина на уровне М<sup>2</sup>–М<sup>2</sup> – 8.15; ширина на уровне М<sup>3</sup>–М<sup>3</sup> – 8.6; длина С<sup>1</sup>–М<sup>3</sup> – 8.3 (dex, sin);

**Таблица 2.** Размеры (в мм) нижней челюсти и нижних зубов *Rhinolophus macrorhinus* Topál, 1963 (*n* – число экземпляров)

Параметры	<i>R. macrorhinus cimmerius</i> subsp. nov.			<i>R. macrorhinus anomalidens</i> [6]	<i>R. cf. macrorhinus</i> [7, 8]		
	<i>n</i>	пределы	среднее	пределы	<i>n</i>	пределы	среднее
Длина $C_1-M_3$	4	8.7–9.2	8.85	9.05–9.6	–	–	–
Длина $C_1-P_4$	7	3.0–3.45	3.24	3.36–3.6	2	3.36–3.38	3.37
Длина $P_2-M_3$	7	7.6–8.1	7.84	–	–	–	–
Длина $P_2-P_4$	10	2.0–2.35	2.15	–	–	–	2.36
Длина $P_4-M_3$	28	6.8–7.3	7.03	7.1–7.6	–	–	–
Длина $M_1-M_3$	41	5.7–6.15	5.9	5.71–6.2	2	6.04–6.2	6.12
Длина $C_1$	7	1.2–1.3	1.26	1.5 (голотип)	2	1.3	1.3
Ширина $C_1$	7	1.4–1.6	1.5	1.72 (голотип)	–	–	–
Длина $P_2$	10	0.85–1.0	0.91	0.86–1.0	–	–	–
Ширина $P_2$	9	0.95–1.3	1.13	1.04–1.27	–	–	–
Длина $P_3$	7	0.25–0.38	0.31	–	–	–	–
Ширина $P_3$	7	0.3–0.65	0.42	–	–	–	–
Длина $P_4$	43	1.15–1.4	1.26	1.18–1.45	6	1.36–1.43	1.39
Ширина $P_4$	43	1.15–1.45	1.29	1.13–1.4	6	1.21–1.49	1.34
Длина $M_1$	75	2.05–2.25	2.16	2.0–2.27	5	2.07–2.21	2.17
Ширина талонида $M_1$	71	1.3–1.6	1.45	1.31–1.54	5	1.38–1.58	1.5
Длина $M_2$	68	1.9–2.2	2.0	1.9–2.13	4	2.08–2.1	2.09
Ширина талонида $M_2$	66	1.3–1.6	1.46	1.27–1.54	4	1.41–1.64	1.52
Длина $M_3$	56	1.75–1.95	1.88	1.81–2.03	3	1.93–2.0	1.96
Ширина тригониды $M_3$	57	1.2–1.5	1.35	–	3	1.29–1.41	1.36
Ширина талонида $M_3$	56	1.05–1.3	1.18	1.04–1.27	2	1.14–1.15	1.15
Постдентальная длина	43	5.35–6.15	5.8	–	–	–	–
Высота в венечном отростке	46	3.9–4.4	4.14	4.05–4.36	–	–	–

длина  $C^1-P^4$  – 3.15 (dex, sin); длина  $P^2-M^3$  – 6.7 (dex); длина  $P^4-M^3$  – 6.4 (dex, sin); длина  $M^1-M^3$  – 5.3 (dex, sin). Отношение длины небного мостика к длине  $C^1-M^3$  – 0.325; отношение длины  $M^1-M^3$  к длине  $C^1-P^4$  – 1.68.

Экз. ПИН, № 5644/936: длина небного мостика – 3.1; высота носового вздутия – 4.1; межглазничная ширина – 2.9; ширина на уровне  $C^1-C^1$  – 6.2; ширина на уровне  $M^2-M^2$  – 8.4; ширина на уровне  $M^3-M^3$  – 8.7; длина  $C^1-M^3$  – 8.5 (dex); длина  $C^1-P^4$  – 3.3 (dex); длина  $P^4-M^3$  – 6.45 (dex); длина  $M^1-M^3$  – 5.3 (dex); наименьшее расстояние между  $C^1$  и  $P^4$  – 0.1 (dex). Отношение длины небного мостика к длине  $C^1-M^3$  – 0.365; отношение длины  $M^1-M^3$  к длине  $C^1-P^4$  – 1.61.

Экз. ПИН, № 5644/939: длина небного мостика – 2.7; высота носового вздутия – 4.2; ширина на уровне  $M^2-M^2$  – 8.0; длина  $P^4-M^3$  – 6.35 (dex);

длина  $M^1-M^3$  – 5.3 (dex); длина латерального тяжа антеровентральной турбиналии – 3.1, высота горизонтальной порции латерального тяжа антеровентральной турбиналии – 0.5.

Экз. ПИН, № 5644/821: длина  $C_1-M_3$  – 8.8; длина  $C_1-P_4$  – 3.1; длина  $P_2-M_3$  – 7.6; длина  $P_2-P_4$  – 2.0; длина  $P_4-M_3$  – 6.9; длина  $M_1-M_3$  – 5.7; постдентальная длина – 6.0; высота в венечном отростке – 4.2.

Экз. ПИН, № 5644/822: длина  $C_1-M_3$  – 8.7; длина  $C_1-P_4$  – 3.2; длина  $P_2-M_3$  – 7.7; длина  $P_2-P_4$  – 2.15; длина  $P_4-M_3$  – 6.8; длина  $M_1-M_3$  – 5.8; постдентальная длина – 5.7; высота в венечном отростке – 4.1.

**Изменчивость.** Положение небного мостика относительно верхнего зубного ряда у описываемой формы изменчиво – его передний и задний края находятся соответственно на уровне

паракона  $M^1$  и мезостилия  $M^2$  (экз. ПИН, №№ 5644/815, 938), паракона  $M^1$  и метакона  $M^2$  (экз. ПИН, № 5644/810), протокона  $M^1$  и метакона  $M^2$  (голотип; экз. ПИН, №№ 5644/801–803, 805, 939, 950), мезостилия  $M^1$  и метастилия  $M^2$  (экз. ПИН, №№ 5644/804, 952), протокона  $M^1$  и парастилия  $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/936). У современных крупных подковоносов *R. ferrumequinum* (Schreber, 1774) и *R. nippon* Temminck, 1835 передний край небного мостика характеризуется более постоянным положением – немного дистальнее уровня вершины метакона  $M^1$  у *R. ferrumequinum*, на уровне или немного мезиальнее мезостилия  $M^1$  у большинства *R. nippon* [14].

$P_3$  полностью редуцирован (нет альвеолы  $P_3$  между альвеолами  $P_2$  и  $P_4$ ) в двух случаях (экз. ПИН, №№ 5644/849, 851; рис. 1р), тогда как его присутствие наблюдается в 82 случаях (семь экземпляров с сохранившимся  $P_3$ : экз. ПИН, №№ 5644/775, 776, 821, 822, 852, 853, 974; 75 экземпляров – с альвеолой  $P_3$ ), т.е. у 97.6% всех изученных экземпляров.

В материале имеется несколько лишенных корней и не вполне сформированных в основании нестертых коронок нижних моляров ( $M_1$ , экз. ПИН, №№ 5644/916, 945;  $M_2$ , экз. ПИН, №№ 5644/917, 918), которые принадлежали ювенильным особям с еще не прорезавшимися коренными зубами. Обусловленная стиранием онтогенетическая изменчивость зубной системы отражена увеличением площади фасеток стирания и уменьшением высоты зубных бугорков. У наиболее старых особей из-за сильного стирания жевательная поверхность моляров выровнена, высота главных бугорков клыков и больших премоляров заметно уменьшена, малые премоляры также несут следы стирания (рис. 4г).

На экз. ПИН, № 5644/822  $M_1$  частично разрушен – отколота лингвальная стенка коронки на участке от передней части метаконида до середины энтокониды, в результате чего вскрыта полость зуба в области метаконида. Видимо, это прижизненное повреждение, так как поверхность и границы слома заглажены и слегка затерты (рис. 1д, 1м, 4в), что может свидетельствовать о довольно продолжительном функционировании данного зуба после травмы.

Сравнение и замечания. Крупные верхние зубы, сильно развитые полки гипокона  $M^1$ – $M^2$ , относительно длинный и узкий  $M^3$  и степень редукции малых премоляров  $P^2$  и  $P_3$  позволяют отнести раннеплейстоценового крымского подковоноса к виду *R. macrorhinus* – широко распространенному в Центральной и Юго-Восточной Европе в начале плейстоцена представителю крупных подковоносов из группы *R. ferrumequinum* [5–7, 15–17].

Новый подвид отличается от *R. m. macrorhinus* Torál, 1963 из виллафранка Венгрии (Беременд 4) более мелкими размерами, существенно меньшей высотой носовой выпуклости (табл. 1), наличием постеролингвального углубления в основании коронки  $C^1$ , а также заметно большим расстоянием между полкой гипокона  $M^2$  и задним краем верхнечелюстной кости.

Отличия нового подвида от поздневиллафранкского *R. m. anomalidens* Torál, 1979 включают слабее выраженную носовую выпуклость, относительно мелкие верхние и нижние клыки (при сходной величине моляров) и менее редуцированные по длине  $M^3$  (табл. 1, 2). Отношение длины  $M^1$ – $M^3$  к длине  $C^1$ – $P^4$  у *R. m. cimmerius* subsp. nov. (1.47–1.68) существенно выше, чем у *R. m. anomalidens* (~1.3–1.4, см. [6]), как и отношение длины  $M_1$ – $M_3$  к длине  $C_1$ – $P_4$  (1.8–1.9 у крымской формы против ~1.7 у *R. m. anomalidens*).

Описание *R. macrorhinus cimmerius* subsp. nov. является первой регистрацией *Rhinolophus* в раннем плейстоцене Крыма. По ряду зубных признаков (величина клыков, отношение длины  $M^1$ – $M^3$  к длине  $C^1$ – $P^4$ , степень редукции  $M^3$ ) новый подвид менее специализирован, чем *R. m. anomalidens*, что подразумевает его происхождение от более древней формы, морфологически близкой *R. m. macrorhinus*.

Современные подковоносы обитают в тропиках, субтропиках и на юге умеренного пояса Восточного полушария, в разнообразных ландшафтах от пустынь до горных лесов, охотятся на насекомых и других мелких членистоногих поблизости от убежищ. Большой подковонос *R. ferrumequinum* населяет пустынные предгорья и лиственные леса, часто селится в пещерах. Обилие остатков *R. macrorhinus cimmerius* subsp. nov. в нижнеплейстоценовых отложениях пещеры Таврида свидетельствует о теплом климате и наличии как открытых, так и лесных биотопов во времена формирования данного местонахождения.

Материал. Помимо голотипа, из пещеры Таврида (из разных точек и уровней) 227 экземпляров, в том числе фрагменты лицевой части черепов: с правыми  $C^1$ ,  $P^2$ ,  $P^4$ – $M^3$  и левыми  $C^1$ ,  $P^4$ – $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/801), с правыми и левыми  $C^1$ ,  $P^4$ – $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/936), с левыми  $C^1$ ,  $P^4$ – $M^3$  и правыми  $C^1$ ,  $P^4$ – $M^2$  (экз. ПИН, № 5644/950), с правыми и левыми  $P^4$ – $M^3$  (экз. ПИН, №№ 5644/802, 937, 938), с правыми  $P^4$ – $M^3$  и левыми  $M^1$ – $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/939), с левыми  $C^1$ ,  $P^4$ – $M^2$  и правыми  $P^4$ – $M^2$  (экз. ПИН, № 5644/803), без зубов (экз. ПИН, № 5644/951); ростральные фрагменты черепов: с правыми и левыми  $P^4$ – $M^2$  (экз. ПИН, № 5644/952), с правым  $M^1$  и левыми  $M^2$ – $M^3$  (экз. ПИН, №№ 5644/804, 805), с правыми  $M^1$ – $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/953),

с правыми  $M^1-M^2$  и фрагментом левого  $P^4$  (экз. ПИН, № 5644/954), с правым  $M^1$  (экз. ПИН, №№ 5644/806, 955), без зубов (экз. ПИН, №№ 5644/807, 808); фрагменты межглазничной части черепов (экз. ПИН, №№ 5644/809, 949); фрагменты верхнечелюстных костей: с обломанным  $S^1$  и целыми  $P^2-M^3$  (экз. ПИН, № 5644/810), с  $S^1$  и  $P^2-M^2$  (экз. ПИН, № 5644/956), с  $P^4-M^3$  (экз. ПИН, №№ 5644/811–813, 941, 942, 957–959), с  $P^4-M^2$  (экз. ПИН, №№ 5644/814–816), с  $P^4-M^1$  (экз. ПИН, № 5644/960), с  $P^4$  (экз. ПИН, №№ 5644/961, 962), с обломанным  $P^4$  (экз. ПИН, № 5644/963), с  $M^1-M^3$  и обломанным  $P^4$  (экз. ПИН, № 5644/771), с  $M^1-M^2$  и обломанным  $P^4$  (экз. ПИН, № 5644/772), с  $M^1$  и обломанным  $P^4$  (экз. ПИН, № 5644/818), с  $M^3$  и обломанным  $P^4$  (экз. ПИН, № 5644/773), с  $M^1-M^3$  (экз. ПИН, №№ 5644/817, 964), с  $M^1-M^2$  (экз. ПИН, № 5644/965), с  $M^1$  (экз. ПИН, № 5644/966), с  $M^2-M^3$  (экз. ПИН, № 5644/967–969), с  $M^2$  (экз. ПИН, №№ 5644/819, 970), с  $M^3$  (экз. ПИН, № 5644/880), без зубов (экз. ПИН, №№ 5644/820, 971–973, 983, 997); полные или почти полные нижнечелюстные кости: с  $S_1, P_2, P_3$  и  $P_4-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/821, 822, 974), с  $S_1, P_2$  и  $P_4-M_3$  (экз. ПИН, № 5644/823), с  $P_2$  и  $P_4-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/774, 824, 825), с  $P_3$  и  $P_4-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/775, 776), с  $P_4-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/777, 826–831, 833–839, 975–978), с  $M_1-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/778, 840–846, 979, 980), с  $M_1$  (экз. ПИН, № 5644/981), с  $M_2-M_3$  (экз. ПИН, № 5644/779), без зубов (экз. ПИН, №№ 5644/780, 847–851, 913, 982); фрагменты нижнечелюстных костей: с  $S_1, P_2, P_3$  и  $P_4-M_2$  (экз. ПИН, № 5644/852), с  $S_1, P_2, P_3$  и  $P_4-M_1$  (экз. ПИН, № 5644/853), с  $S_1, P_2$  и  $P_4$  (экз. ПИН, № 5644/984), с  $P_4-M_3$  (экз. ПИН, № 5644/855), с  $P_4-M_2$  (экз. ПИН, № 5644/985), с  $P_4-M_1$  и обломанным  $M_2$  (экз. ПИН, № 5644/904), с  $P_4-M_1$  (экз. ПИН, №№ 5644/781, 856–861, 905, 986, 987), с  $P_4$  (экз. ПИН, №№ 5644/854, 862), с  $M_1-M_3$  и обломанным  $P_4$  (экз. ПИН, № 5644/988), с  $M_1-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/782, 863), с  $M_1-M_2$  (экз. ПИН, №№ 5644/864–868, 989, 995), с  $M_1$  (экз. ПИН, №№ 5644/783, 869), с  $M_1$  и фрагментом  $M_2$  (экз. ПИН, № 5644/921), с  $M_2-M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/870–875, 877, 878, 990–992), с  $M_2$  (экз. ПИН, №№ 5644/879), с  $M_3$  (экз. ПИН, №№ 5644/881, 993, 994), с основаниями  $M_1-M_3$  (экз. ПИН, № 5644/882), с основаниями  $M_2-M_3$  (экз. ПИН, № 5644/920), без зубов (экз. ПИН, №№ 5644/791–799, 883–888, 912, 996); изолированные зубы (экз. ПИН, №№ 5644/784–790, 800, 832, 847, 876, 889–903, 906–911, 914–919, 922–935, 943–948, 998).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен Д.О. Гимранову (Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, Екатеринбург) и А.В. Лаврову (ПИН) за сборы материалов в пещере Таврида, С.В. Багирову и Р.А. Ракитову (ПИН) – за помощь в подготовке фотографий, В.С. Лебедеву (Зоологический музей Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ЗМ МГУ) – за предоставленные для сравнительного изучения материалы по современным рукокрылым из коллекции ЗМ МГУ.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00214, <https://rscf.ru/project/22-14-00214/>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др. Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
2. Лопатин А.В., Тесаков А.С. Раннеплейстоценовая белозубка *Crocidura kornfeldi* (Lipotyphla, Soricidae) из Крыма // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. Т. 501. № 1. С. 499–504.
3. Topál G., Csorba G. The subspecific division of *Rhinolophus luctus* Temminck, 1835, and the taxonomic status of *R. beddomei* Andersen, 1905 (Mammalia, Chiroptera) // Miscellanea Zoologica Hungarica. 1992. V. 7. P. 101–116.
4. Gunnell G.F., Eiting T.P., Geraads D. New late Pliocene bats (Chiroptera) from Ahl al Oughlam, Morocco // Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie. Abh. 2011. V. 260. № 1. P. 55–71.
5. Topál G. Description of a new bat, *Rhinolophus macrorhinus* sp. n. from the Lower Pleistocene of Hungary // Vertebrata Hungarica. 1963. V. 5. № 1–2. P. 219–226.
6. Topál G. Fossil bats of the *Rhinolophus ferrumequinum* group in Hungary (Mammalia: Chiroptera) // Fragmenta Mineralogica et Palaeontologica. 1979. V. 9. P. 61–101.
7. Wołoszyn B.W. Pliocene and Pleistocene bats of Poland // Acta Palaeontologica Polonica. 1987. V. 32. № 3–4. P. 207–325.
8. Wołoszyn B.W. Microevolutionary trends in Western Palaeartic bats. Case study: microevolutionary trends among bats of *Rhinolophus "ferrumequinum"* group (Mammalia: Chiroptera) // Travaux du Muséum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa". 2010. V. 53. P. 413–421.
9. Shimizu M., Miyao T. A study of bats. II. The palatal ridges of the bat // Journal of the Faculty of Liberal Arts, Shinshu University. 1967. Pt 2. № 1. P. 1–25.
10. Eisentraut M. Das Gaumenfaltenmuster der Säugetiere und seine Bedeutung für stammesgeschichtliche und taxonomische Untersuchungen // Bonner Zoologische Monographien. 1976. № 8. P. 1–214.

11. Curtis A.A., Simmons N.B. Unique turbinal morphology in horseshoe bats (Chiroptera: Rhinolophidae) // The Anatomical Record. 2017. V. 300. № 2. P. 309–325.
12. Curtis A.A., Smith T.D., Bhatnagar K.P., et al. Maxillo-turbinal aids in nasophonation in horseshoe bats (Chiroptera: Rhinolophidae) // The Anatomical Record. 2020. V. 303. № 1. P. 110–128.
13. Ito K., Tu V.T., Eiting T.P., et al. On the embryonic development of the nasal turbinals and their homology in bats // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. V. 9. Art. 613545. P. 1–19.
14. Ikeda Y., Jiang T., Oh H., et al. Geographic variations of skull morphology in the *Rhinolophus ferrumequinum* species complex (Mammalia: Chiroptera) // Zoologischer Anzeiger. 2020. V. 288. P. 125–138.
15. Topál G. Bats from the Lowermost Pleistocene Locality 15 at Beremend, Hungary (Mammalia: Chiroptera) // Fragmenta Mineralogica et Palaeontologica. 1985. V. 12. P. 51–57.
16. Stormark J.G. Fossil bat fauna (Mammalia: Chiroptera) from Pliocene/Pleistocene localities in Southern Poland // Karst Waters Institute Special Publication. 1996. № 2. P. 43–44.
17. Rosina V.V., Agadjanian A.K., Shunkov M.V. Bats (Chiroptera) and other small mammals (Rodentia, Lagomorpha, Carnivora) from the Pleistocene site Trlica (Montenegro): biostratigraphical and paleoecological implications // Quaternaire. 2016. V. 27. № 4. P. 353–367.

## EARLY PLEISTOCENE HORSESHOE BAT *RHINOLOPHUS MACRORHINUS CIMMERIUS* SUBSP. NOV. (RHINOLOPHIDAE, CHIROPTERA) FROM THE TAURIDA CAVE IN CRIMEA

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

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

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

Numerous remains (incomplete skull, cranial and mandibular fragments, and isolated teeth) of a large horseshoe bat of the *Rhinolophus ferrumequinum* group are described from the Lower Pleistocene deposits of the Taurida cave in the central Crimea. They are assigned to *Rhinolophus macrorhinus cimmerius* subsp. nov. In dental characters the new subspecies is less specialized than *R. m. anomalidens* Topál, 1979 from the Late Villafranchian of Central Europe, which implies the origin of the former from an earlier form morphologically close to *R. m. macrorhinus* Topál, 1963. The perfect preservation of the cranial structures made it possible to observe the remnants of the palatal ridges and the morphology of the nasal turbinals of *R. macrorhinus cimmerius* subsp. nov.

**Keywords:** *Rhinolophus macrorhinus*, Rhinolophidae, Chiroptera, Early Pleistocene, Taurida cave, Crimea, palatal ridges, nasal turbinals

УДК 591.4

## АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРЕДШЕСТВУЮТ ЗАРАЖЕНИЮ СИМБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ ЛИЧИНОК ПОГОНОФОР (Siboglinidae, Annelida)

© 2022 г. Н. Н. Римская-Корсакова<sup>1,\*</sup>, Е. Н. Темерева<sup>1</sup>, академик РАН В. В. Малахов<sup>1</sup>

Поступило 27.04.2022 г.  
После доработки 22.05.2022 г.  
Принято к публикации 25.05.2022 г.

Впервые исследовано тонкое строение стенки тела и кишки у компетентных личинок френулятной погонофоры *Siboglinum fiordicum*. Впервые зарегистрировано явление массового апоптоза ядер клеток кожно-мышечного мешка и целотелия. Апоптотические ядра обнаружены как в цитоплазме клеток, так и вне тела личинки. В последнем случае каждое ядро окружено плазмалеммой, а все скопление покрыто кутикулой. Клетки личиночной кишки сохраняют обычное строение: их цитоплазма заполнена многочисленными желточными гранулами, а ядра имеют обычное строение. Сходные процессы ранее были описаны у вестиментифер и инициировались проникновением симбиотических бактерий через покровы в кишечник. Вероятно, у *S. fiordicum* процесс апоптотической перестройки клеток стенки тела и становления уникального симбиоза с бактериальными симбионтами разнесены во времени и происходят не одновременно, как у вестиментифер, а последовательно.

**Ключевые слова:** френулятные погонофоры, трофосома, симбиотические бактерии, заражение, Siboglinidae, Frenulata

**DOI:** 10.31857/S2686738922050249

Погонофоры, или френулятные погонофоры (Annelida: Siboglinidae) – это тубикольные черви, населяющие восстановительные биотопы такие, например, как, метановые сипы, периферия гидротермальных источников, богатые органикой осадки и др. В середине XX века френулятные погонофоры рассматривались как отдельный тип животного царства, близкий ко вторичноротым животным [1]. В настоящее время в результате морфологических и молекулярно-филогенетических исследований было надежно установлено положение погонофор внутри типа Annelida среди остальных бескишечных зибоглинид, включающих такие широко известные группы, как вестиментиферы Vestimentifera и черви-костоеды *Osedax* [2–4]. При этом френулятные погонофоры (Frenulata) являются сестринской кладой ко всем остальным зибоглинидам, что делает их

ключевой группой в изучении строения и развития Siboglinidae.

Наиболее своеобразными чертами организации Siboglinidae являются отсутствие во взрослом состоянии рта и кишечника и питание за счет симбиотических бактерий, населяющих клетки трофосомы [5]. Бактерии не передаются от материнского организма к развивающимся ооцитам, как при вертикальной передаче, но зибоглиниды приобретают бактерий горизонтально, из окружающей среды каждый раз на стадии осевшей личинки [6]. У вестиментифер, произошедших позднее погонофор в эволюции, описано, что заражение бактериями происходит через покровы туловищного отдела тела личинок. Бактерии способствуют пролиферации мезодермальных клеток, которые формируют трофосому, орган симбиотического питания, при этом ранее функционирующая кишка деградирует, а покровы и остальные ткани, через которые проникали бактерии, погибают путем апоптоза клеток [7]. Для френулятных погонофор до сих пор считается,

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
\*e-mail: nadezdakorsakova@gmail.com

что бактерии попадают в тело личинок через рот, заселяют эпителий кишки, которая трансформируется в трофосому [8].

Благодаря уникальному симбиозу с бактериями черви всей группы Siboglinidae смогли колонизировать экстремальные условия, такие как жерла гидротермальных источников (вестиментиферы) и захоронения костей китов (*Osedax*), углеводородные высачивания (вестиментиферы и погонофоры). Процесс становления симбиоза до сих пор остается загадочным и требует новых данных для понимания эволюции группы и возникновения этого уникального явления.

Целью настоящей работы было исследование строения кожно-мышечного мешка, целотелия и кишки оседающей личинки френулятной погонофоры *Siboglinum fiordicum* Webb, 1963 на ультраструктурном уровне для оценки состояния тканей личинки перед заражением бактериальными симбионтами.

Для изучения ультраструктуры компетентных личинок *S. fiordicum* мы поставили эксперименты по оседанию личинок в лабораторных условиях. Морской осадок и материнские особи *S. fiordicum* были собраны дночерпателем с глубины 35 м вблизи Морской биологической станции Эсперенд, Университета Бергена, Норвегия в сентябре 2018 г. Извлеченные из материнских трубок личинки разных возрастов, от трохофор до компетентных личинок, имеющие в длину от 200 до 500 микрон, перенесены в чашки с осадком, собранным вместе с материнскими особями, для содержания при температуре 6°C [9, 10]. Через несколько недель в культуральных чашках обнаружены компетентные личинки, имеющие длину тела 800 мкм. Три компетентные личинки были зафиксированы в 3% растворе глутаральдегида на морской воде, постфиксированы в 1% тетрадоксиде осмия на морской воде и заключены в смолу Спурр. Тонкие срезы были изготовлены с использованием алмазного ножа DIATOM на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Тонкие срезы были перенесены на медные бленды и проконтрастированы уранил ацетатом и цитратом свинца. Материал был изучен с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM 1011 (JEOL Ltd., Япония).

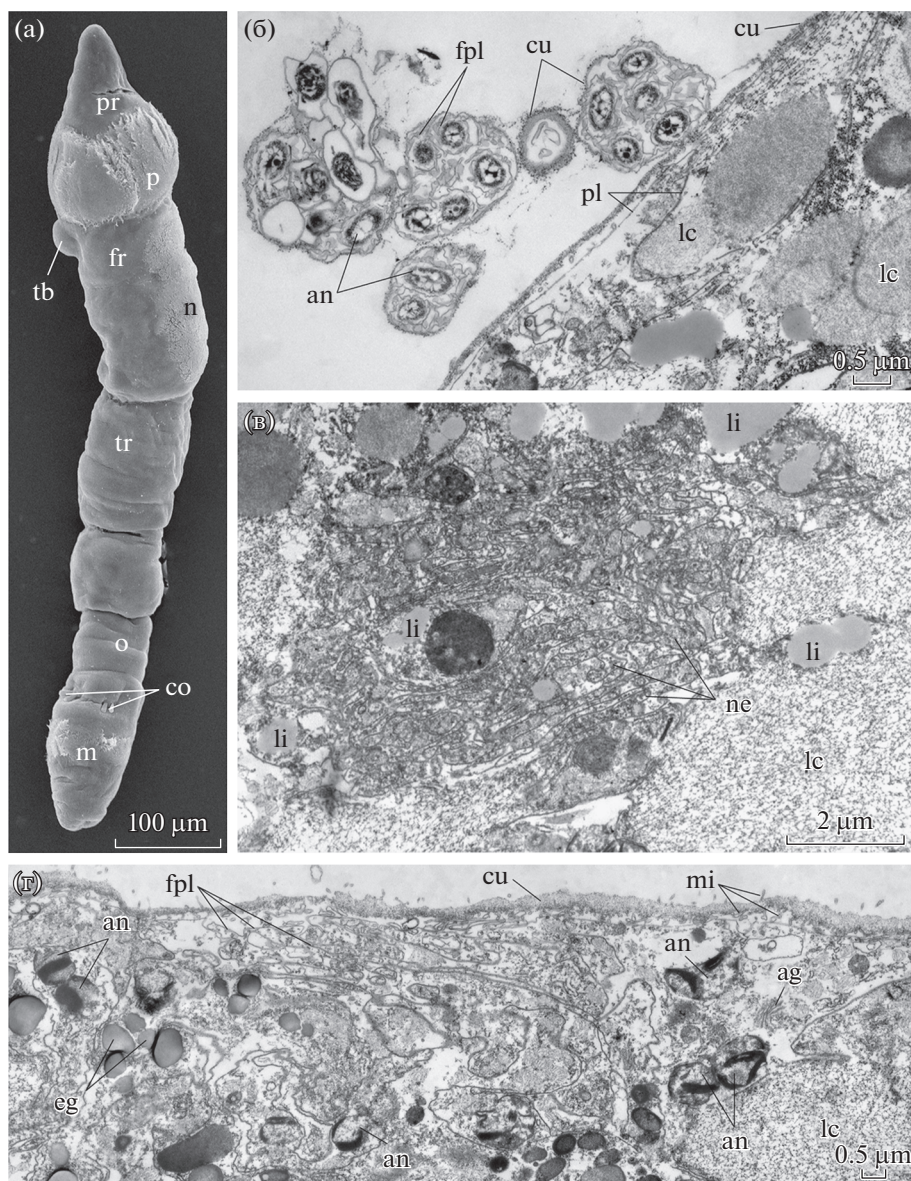
Длина тела предметаморфозных личинок составляет около 800 мкм (рис. 1а). Тело состоит из простомиума, перистомиума, передней части (2-й сегмент, несущий кутикулярный киль уздечки и зачаток щупальца), туловища (3-й сегмент с двумя рядами щетинок пояса), более шести опистосомных сегментов и пигидия (рис. 1а). Имеются ресничные шнуры прототроха, невротроха (вентральная ресничная полоска) и мезотроха.

Имеются щетинки первого опистосомального сегмента и щетинки аннулы (рис. 1а). Тело личинки покрыто кутикулой.

В ходе исследования тонкого строения покровного эпидермиса обнаружено, что форма клеток сильно изменена: клетки выглядят вздутыми и набитыми рыхлой (хлопьевидной или волокнистой) тканью, полярность эпителия была нарушена: слой базальной пластинки обнаруживается лишь на некоторых участках эпителия, клеточные контакты отсутствуют (рис. 1б–г). Мембраны клеток формируют многочисленные фестончатые складки (рис. 1б, г). По периферии клеток располагаются участки или целые апоптозирующие ядра, которые имеют характерное для апоптоза тонкое строение: у них часто нарушена ядерная мембрана, а хроматин собран в электронно-плотные периферические тяжи (рис. 1г). Над поверхностью тела личинки обнаруживаются очень необычные тела, представляющие собой скопления ядер, выброшенных из стенки тела личинки (рис. 1б). Снаружи каждое тело окружено кутикулой, внутри тела сгруппировано от одного до семи фрагментированных ядер, каждое из которых окружено сморщенной плазматической мембраной (рис. 1б).

Продольная и кольцевая мускулатура тела, характерная для личинок младшего возраста, на этой стадии отсутствует, также отсутствует специальная мускулатура щетинок и первой септы тела. Предполагаемые мышечные клетки деградируют, они лишены ядер и миофиламентов, их цитоплазма заполнена рыхлым волокнистым содержимым. Клетки целотелия также находятся на стадии деградации. Многоклеточные тубипарные железы сохраняются на этой стадии, и их протоки, выстланные микровиллярным эпителием, прослеживаются между дегенерирующих клеток стенки тела. Просвет тубипарных желез заполнен электронно-светлым секретом будущей трубки. В покровах простомиума обнаруживаются нормально развитые интраэпидермальные стволы нервной системы (рис. 1в). Личинка имеет кишку, крошечную ротовую воронку и терминальную анальную ямку. Кишка не имеет полости, наоборот, ее клетки набиты желтком так, что во внутреннем просвете кишки, поверхности клеток тесно сближены и ее просвет не прослеживается.

Недавними исследованиями вестиментифер с помощью методов просвечивающей трансмиссионной электронной микроскопии и молекулярно-генетического метода Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) показано, что заражение бактериями происходит через покровы туловищного отдела личинок [7]. Бактерии через покровы проникают в спинной мезентерий между спинным кровеносным сосудом и кишкой и вызывают про-



**Рис. 1.** Внешний вид (а) и тонкое строение покровов (б–г) предметаморфозных личинок *Siboglinum fiordicum*. а – внешний вид личинки, растровая электронная микроскопия; б – выброшенные из стенки тела личинки скопления от одного до семи фрагментированных ядер, каждое из которых окружено сморщенной плазматической мембраной, а все скопление целиком окружено кутикулой, электронограмма; в – нормально развитые интраэпидермальные околоплоточные коннективы, электронограмма; г – клетки покровного эпидермиса выглядят вздутыми и набитыми рыхлой тканью, мембраны клеток формируют многочисленные фестончатые складки, а по периферии клеток располагаются участки или целые апоптозирующие ядра, электронограмма. ag – аппарат Гольджи, an – апоптотические ядра, са – щетинки аннулы, со – щетинки первого сегмента опистосомы, cu – кутикула, eg – электронно плотные включения, f – кутикулярный киль уздечки, fr – передняя часть, fpl – сморщенная плазмалемма, lc – рыхлая (сетчатая или волокнистая) цитоплазма, li – липидные капли, m – мезотрох, mi – микровилли, n – невротрох (вентральная ресничная полоска), ne – нейриты, o – первый сегмент опистосомы, p – прототрох, ре – перистомииум, pl – плазмалемма, пр – простомииум, ру – пигидий, tb – зачаток щупальца, tr – туловищный сегмент.

лиферацию клеток спинного мезентерия. Эти многочисленные клетки заселяются бактериями и формируют трофосому. При этом эпидермис и все внутренние ткани, через которые бактерии проникали внутрь тела, претерпевают апоптоз

[7]. Таким образом, у вестиментифер процессы проникновения бактерий и обновления тканей путем апоптоза происходят одновременно. При этом кишка практически полностью деградирует и перестает функционировать, а трофосома фор-



мируется *de novo* из тканей мезодермального происхождения.

Наши данные показывают, что у предметаморфозных оседающих личинок френулятных погонофор *S. fiordicum* ткани покровов, мускулатуры и целотелия претерпевают апоптотические процессы, часть ядер фрагментируются и лизируются внутри клеток эпидермиса, другая часть апоптотических ядер выбрасывается наружу. Цитоплазма клеток заполняется рыхлым веществом, а большинство клеточных органелл разрушается. Бактерии в покровах на этой стадии не обнаруживаются. Мы предполагаем, что у френулятных погонофор апоптотические процессы в эпидермисе и мезодермальных тканях предшествуют заселению тканей потенциальными бактериальными симбионтами.

При этом эндодермальные ткани сохраняют свое личиночное состояние: клетки личиночной кишки заполнены желтком и не претерпевают никаких изменений. Рот и анус имеются, но не связаны с кишкой. Это может свидетельствовать о том, что личинка использует кишку не для потребления новых веществ извне через рот, а как депо желтка, доставшегося от материнского организма. Анатомия пищеварительного тракта, целостность кишечного эпителия, а также отсутствие в кишке бактериальных симбионтов могут свидетельствовать, что проникновение бактерий происходит не алиментарно, а через покровы, как это было описано у личинок вестиментифер.

Таким образом, у френулятных погонофор, которые являются сестринской группой по отношению к другим зибоглинидам, деградация покровов и мускулатуры предшествует заселению бактериями тела личинок. Сравнение процесса заражения погонофор и вестиментифер показывает, что у вестиментифер, которые в эволюции произошли позже, проникновение бактерий, обновление тканей, через которые происходила заражение бактериальными симбионтами, и начало формирования трофосомы в теле личинки происходят одновременно.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Н.Е. Будаевой и сотрудникам Морской биологической станции Эспегренд (Университет Бергена, Норвегия) за помощь в сборе погонофор.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано грантом РНФ 20-74-10011.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ivanov A.V.* Pogonophora (The Pogonophorans), Fauna of the USSR, new series // 1960. Academy of, V. 75.
2. *Rousset V., Rouse G.W., Siddall M.E., Tillier A., and Pleijel F.* Cladistics 18S rRNA, 28S rRNA and morphological data. // Cladistics. 2004. V. 20. P. 518–533.
3. *Struck T.H. et al.* Phylogenomic analyses unravel annelid evolution. // Nature. 2011. V. 471. P. 95–98.
4. *Li Y. et al.* Phylogenomics of tubeworms (Siboglinidae, Annelida) and comparative performance of different reconstruction methods. // Zool. Scr. 2017. V. 46. № 2. P. 200–213.
5. *Hilário F. et al.* New perspectives on the ecology and evolution of siboglinid tubeworms. // PLoS One. 2011. V. 6. № 2.
6. *Feldman R.A., Black M.B., Cary C.S., Lutz R.A., and Vrijenhoek R.C.* Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1997. V. 6. № 3. P. 268–277.
7. *Nussbaumer A.D., Fisher C.R., and Bright M.* Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. // Nature. 2006. V. 441. № 7091. P. 345–348.
8. *Southward E.C.* Development of perviata and vestimentifera (pogonophora). // Hydrobiologia. 1999. V. 402. P. 185–202.
9. *Bakke T.* Development of *Siboglinum fiordicum* Webb (Pogonophora) after metamorphosis. // Sarsia. 1977. V. 63. № 2. P. 65–73.
10. *Rimskaya-Korsakova N. et al.* Myogenesis of *Siboglinum fiordicum* sheds light on body regionalisation in beard worms (Siboglinidae, Annelida). // Front. Zool. 2021. V. 18. № 1. P. 1–24.

## АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРЕДЕДУЮТ ИНФЕКЦИОННОМУ ЗАРАЖЕНИЮ ЛАРВ ПОГОНОФОРОВ (СИБОГЛИНИДЫ, АННЕЛИДЫ)

N. N. Rimskaya-Korsakova<sup>a,#</sup>, E. N. Temereva<sup>a</sup>, and Academician of the RAS V. V. Malakhov<sup>a</sup>

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

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

The fine structure of the body wall and gut in competent larvae of the frenulate pogonophoran *Siboglinum fiordicum* for the first time was studied. The phenomenon of mass apoptosis of the nuclei of cells of the epidermis, musculature, and coelomic epithelium, for the first time was shown. Apoptotic nuclei were found in the cytoplasm of cells and outside of the larval body. In the latter case, each nucleus is surrounded by a plasmalemma, and the entire cluster is covered by a cuticle. The cells of the larval gut retain the usual structure: their cytoplasm is filled with numerous yolky granules, and the nuclei have the usual state. Similar apoptotic processes which is previously described in vestimentiferans were initiated by the penetration of symbiotic bacteria through the integument into the dorsal mesenterium. Probably, in *S. fiordicum*, the process of apoptotic rearrangement of body wall cells and the formation of a unique symbiosis with bacteria are time-spaced and do not happen simultaneously, as in vestimentiferans, but sequentially.

**Keywords:** frenulate pogonophorans, trophosome, symbiotic bacteria, infection, Siboglinidae, Frenulata

УДК 597.83

## ПЕРЕСТРОЙКА ОПТОКИНЕТИЧЕСКОГО РЕФЛЕКСА В ПЕРИОД МЕТАМОРФОЗА У ОБЫКНОВЕННОЙ ЧЕСНОЧНИЦЫ (*Pelobates fuscus*, Laur.)

© 2022 г. Е. И. Киселева<sup>1</sup>, О. Ю. Орлов<sup>2</sup>, В. А. Бастаков<sup>1,2,\*</sup>

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым

Поступило 24.04.2022 г.

После доработки 26.05.2022 г.

Принято к публикации 26.05.2022 г.

Исследована перестройка системы стабилизации зрения у обыкновенной чесночницы методом количественного анализа оптомоторной реакции с использованием видеосъемки. Стабилизация зрения – важная составляющая в системе нейронных механизмов формирования глубины зрительного пространства. Показано, что у головастика обыкновенной чесночницы, ведущий водный образ жизни, оптомоторная реакция похожа на таковую рыб (движение животного в направлении движения зрительного фона и нистагм глаз, состоящий из быстрой и медленной фаз). В период метаморфоза (переход от водного к наземному образу жизни) сеголетки чесночниц реагировали на движение зрительного фона нистагмом глаз и головы. Через год после метаморфоза сеголетки чесночниц реагировали в ответ на движение зрительного фона как взрослые бесхвостые амфибии – только нистагмом головы (медленная и быстрая фазы), а движения глаз практически отсутствовали. Обсуждены вопросы, связанные с причинами утраты бесхвостыми амфибиями в процессе эволюции активных движений глаз.

**Ключевые слова:** оптокинетический рефлекс, стабилизация зрения, амфибии, *Pelobates fuscus*

**DOI:** 10.31857/S2686738922050158

Стабилизация изображения на сетчатке во время собственных перемещений имеет огромное значение для всех животных, ведущих активный образ жизни. Быстрое смещение изображения по сетчатке может привести к расфокусированию изображения, к утрате контраста и остроты зрения. Стабилизация изображения на сетчатке предназначена для сведения к минимуму этих разрушительных последствий движений тела и головы на способность адекватно воспринимать структурированную окружающую среду. Стабилизацию изображения как во время собственных перемещений, так и во время движения всего или большей части зрительного фона (как, например, при движении листьев и веток деревьев во время порывов ветра) обеспечивают компенсаторные рефлексы, которые активируются в вестибулярной системе, в сетчатке и проприоцептивной системе [1, 2]. Зрительная составляю-

щая системы стабилизации зрения изучена в т.н. оптокинетической реакции. В лабораторных условиях эта реакция выявляется в ответ на движение всего или большей части зрительного фона и традиционно в качестве стимула используются движущиеся перемежающиеся черные и белые полосы. При такой стимуляции лягушки и жабы реагируют прослеживающими движениями головы и/или глаз и быстрым возвратом глаз и/или головы в исходное положение – компенсирующие движения [2, 3]. Оптокинетический рефлекс в ответ на движение полос оптомоторного барабана можно рассматривать как ответ на «динамическую» имитацию ситуации, которая возникает на сетчатке во время собственных перемещений животного и позволяет оценить отдельно вклад зрительных и других механизмов в систему стабилизации зрения при собственной локомоторной активности. Но недавно получены данные о новом альтернативном механизме стабилизации зрения у головастика шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), посредством которого копии ритмических моторных команд из центров спинного мозга (генерирующих волнообразные движения хвоста) могут напрямую вызывать движения глаз, подходящие, как считают авторы, для стабилизации изображения во время перемещений животного,

<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: perrli@yandex.ru

и провоцировать компенсирующие движения глаз перед моторным актом [4]. Схожие результаты были получены и на мальках *Danio rerio* [5]. Показано также, что у постоянно живущих в воде *Xenopus laevis* в период метаморфоза происходит переключение источников регуляции движениями глаз от моторных центров спинного мозга с хвостового на центры, генерирующие моторные команды задних конечностей [6]. Альтернативный механизм стабилизации зрения при собственных перемещениях важен для водных животных, которые большую часть жизни активно двигаются, — мальки и взрослые рыбы, личинки тритонов, головастики и водные лягушки. Но при переходе большинства видов бесхвостых амфибий в период метаморфоза на наземный образ жизни от рыбоподобной личинки удельный вес оптокинестических и вестибулярных механизмов стабилизации должен возрастать, поскольку постметаморфозные и взрослые бесхвостые амфибии в значительной своей части малоподвижны и, в нагульный период проявляют себя как засадные хищники, за исключением относительно коротких периодов весенних и осенних миграций.

Целью настоящей работы являлось изучение перестройки зрительной составляющей системы стабилизации зрения в ряду головастики — животные в период метаморфоза — взрослые в возрасте один год.

В экспериментах использовали 24 головастика на 36–38 стадии развития, 15 особей на стадии метаморфоза (45–46 стадии) (Gosner, 1960) и 16 годовалых особей чесночницы обыкновенной (*Pelobates fuscus Laur.*). Отлов головастика производили в естественном водоеме в районе реки Москва около деревни Шихово, Звенигородского района, Московской области. Головастики на стадии 36–38 [7] содержали в аквариумах из пластика объемом 15 л по пять особей в каждом. Воду в аквариумах периодически меняли. Головастики кормили детритом из родного водоема, а также вареными и растертыми листьями молодой крапивы (*Urtica dioica L.*). Годовалые чесночницы содержались индивидуально, каждая в своем аквариуме, где поддерживался высокий уровень влажности. Чесночниц кормили кузнечиками, а также различными двукрылыми. Для исследования зрительных реакций в ответ на движение зрительного фона использовали оптомоторный барабан, представляющий из себя цилиндр диаметром 17 см, на внутреннюю поверхность которого были нанесены чередующиеся черные и белые полосы шириной 2.5 см. В предварительных опытах были определены эти параметры стимула как оптимальные как для взрослых чесночниц и их головастика. Барабан приводился в движение электрическим мотором с редуктором, что позволяло менять скорость его вращения в диапазоне от 0.3 до 3 см/с. Далее скорость рассчитывали в

угловых градусах в сек. При исследовании особенностей оптомоторной реакции животных в период метаморфоза использовали оптимальные параметры стимула, выявленные в опытах со взрослыми животными. Реальную скорость стимула рассчитывали с учетом положения животного в стеклянном цилиндре (15 см в диаметре), поскольку и головастики, и взрослые чесночницы во время эксперимента обычно располагались ближе к стенкам цилиндра. Поведение животных в ответ на движение полос барабана регистрировали на цифровую видеокамеру Samsung HMX-S16. Скорость видеосъемки составляла 50 кадров/с. В отдельных случаях, для учета быстрых движений глаз и головы животных в оптомоторном барабане скорость видеорегистрации составляла 300 кадров/с. Для анализа поведения головастика и взрослых чесночниц использовали видео редакторами iMovie и QuickTime Player, Movavi. Время тестирования составляло 60 с для трех возрастных групп чесночниц — головастика, сеголеток и чесночниц возрастом один год. Перед тестированием животных адаптировали к условиям эксперимента в течение одной минуты. Видеоа материал анализировали и оценивали количество движений глаз, головы и тела, которые вызывались движением полос оптомоторного барабана (нистагм глаз, нистагм головы, проявления смещенной активности — моргания и вытирающие движения лапами глаз). Также была измерена амплитуда движений глаз у одного головастика. Из каждой возрастной группы чесночниц в экспериментах использовали по 10 особей. Полученные экспериментальные данные обработаны статистически. Для статистической обработки полученного материала использовали программу STATISTICA. Для сравнения числа движений глазами и головой внутри каждой возрастной группы использовали критерий Фридмана и Вилкоксона для сопряженных пар. Также этот критерий использовали для сравнения среднего количества нистагмов глаз головастика в ответ на все варианты скорости движения чередующихся полос оптомоторного барабана. Для сравнения разницы в числе движений глазами и головой между группами разного возраста использовали критерий Манна–Уитни.

Суммарные данные по трем возрастным группам чесночниц — головастики, метаморфы и чесночницы в возрасте 1 год представлены в табл. 1. Для каждой возрастной группы подсчитывали количество визиомоторных реакций в ответ на движение оптомоторного стимула. Учитывали нистагм глаз, нистагм головы, перемещение животного в направлении и против направления движения стимула для 10 представителей каждой из возрастных групп животных за 60 с.

**Таблица 1.** Реакции обыкновенной чесночницы на оптомоторный стимул на разных стадиях индивидуального развития

Стадии онтогенеза по Госнеру (Gosner, 1960)	Поведенческая реакция			
	нистагм		перемещение животного в/или против направления движения полос барабана	особенности реакции
	глаз	голова		
головастики, стадия 36–38	+	–	–	отмечались только движения глаз* (амплитуда около 20°) и редко некоординированное плавание в направлении движения полос барабана
чесночницы, стадия 45–46 (метаморфоз)	+	+	–	регистрировались как движения глаз* (амплитуда 5–7°), так и нистагм головы (амплитуда 3–5°), метаморфы были мало подвижны
чесночницы в возрасте 1 год	–	+	+	движений глаз нет*, амплитуда нистагма головы составляла 10–15°

\*статистические данные приведены на рис. 2 и 3

Как видно из табл. 1, головастики демонстрируют только движения глаз в ответ на движение оптомоторного стимула.

Систематическое плавание головастиков в направлении движения полос барабана (движение тела в направлении движения полос) отмечалось редко в отличие от взрослых и мальков рыб, у которых эта реакция ярко выражена.

В ответ на движение оптомоторного стимула головастики отчетливо демонстрируют прослеживающие и компенсирующие движения глаз в движущемся оптомоторном барабане. Амплитуда движений глаз у головастиков составляла около 20° (рис. 1). В период метаморфоза наблюдается постепенный переход системы компенсации взора при собственных перемещениях – замена движений глаз в ответ на оптомоторную стимуляцию на таковые движения головой. Обнаруживается определенная динамика данной перестройки, поскольку у большинства лягушат наблюдались одновременно и движения глаз, и движения головы в ответ на движения всего зрительного фона в виде движения чередующихся полос оптомоторного барабана. Последовательность оптомоторной реакции выглядела следующим образом – компенсирующие движения головы и очень редко наблюдались движения туловища в направлении движения полос оптомоторного барабана в ответ на движение полос оптомоторного барабана. Чесночницы в возрасте один год в ответ на движение полос оптомоторного барабана реагируют исключительно движением головы и отчасти тела в направлении движения полос барабана – прослеживание в направлении движения полос барабана и быстрые возвратные движения головой; движений глаз в этих экспериментах не наблюдали. Также следует отметить, что движение полос

оптомоторного барабана у взрослых животных представляет собой некомфортную ситуацию и, как следствие этого, во время тестов наблюдали смещенные реакции – частые моргания глазами и движениями передних лап, имитирующие “смахивания” изображения с глаз. В соотношении числа движений глазами и числа движений головой обнаружены статистически значимые различия во всех трех возрастных группах. При сравнении среднего количества нистагмов глаз головастиков в ответ на все варианты скорости движения чередующихся полос оптомоторного барабана критерий Фридмана показал наличие значимых различий ( $p = 0.00004$ ). Головастики значимо чаще реагировали движениями глаз (критерий Вилкоксона для сопряженных пар:  $N = 10, T = 0, p = 0.005$ ), метаморфы – движениями головы ( $N = 10, T = 0, p = 0.005$ ). Годовалые особи также реагировали значимо чаще движениями головы ( $N = 10, T = 0, p = 0.005$ ). Изменения в соотношении числа движений глазами и головой между головастиками и метаморфами статистически значимы (критерий Манна–Уитни:  $N1 = 10, N2 = 10, U = 0, p = 0.0002$ ). Также изменения в этом соотношении статистически значимы между метаморфами и годовалыми особями обыкновенной чесночницы ( $N1 = 10, N2 = 10, U = 12.5, p = 0.005$ ) (рис. 2, 3).

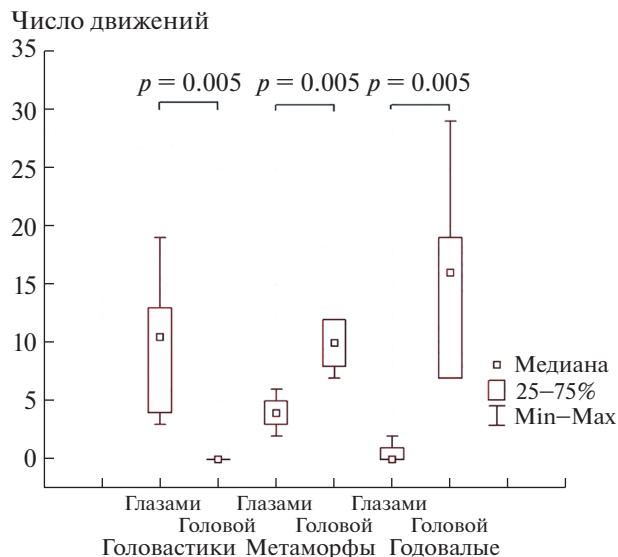
Результаты подсчета количества движений глаз головастиков в оптомоторном барабане представлены на рис. 4, из которого видно, что ответные реакции на оптомоторный стимул с шириной полос около 20° при разных скоростях движения стимула (4°, 12°, 18° и 28°/с) неодинаковы. Более высокие скорости движения оптомоторного стимула (12° и 28°/с) были более эффективны, чем меньшие скорости и достоверно чаще вызы-



**Рис. 1.** Пример нистагма глаз головастика чесночницы. Движения глаз головастика обыкновенной чесночницы в ответ на движение полос оптомоторного барабана. Диаграмма построена по крайним точкам отклонений во время движений глаза.

вали движение глаз (рис. 4). При сравнении среднего количества нистагмов глаз головастика в ответ на все варианты скорости движения чередующихся полос оптомоторного барабана критерий Фридмана показал наличие значимых различий ( $p = 0.00004$ ). Далее, при парном сравнении критерий Вилкоксона показал, что значимых различий в количестве нистагмов в ответ стимулу, движущийся со скоростью  $4^\circ/\text{с}$  и  $12^\circ/\text{с}$ , нет. Также критерий Вилкоксона не выявил значимых различий в количестве нистагмов в ответ стимулу, движущийся со скоростью  $18^\circ$  и  $24^\circ/\text{с}$ . В парном сравнении среднего количества нистагмов глаз головастика в ответ на стимул, движущийся со скоростью  $12^\circ$  и  $18^\circ/\text{с}$ , выявлены значимые различия ( $p = 0.01$ ). Также выявлены значимые различия ( $p = 0.005$ ) в парном сравнении среднего количества нистагмов глаз головастика в ответ на стимул, движущийся со скоростью  $4^\circ/\text{с}$ , и стимул, движущийся со скоростью  $24^\circ/\text{с}$ . Таким образом, среднее количество нистагмов глаз головастика достоверно различается при сравнении стимулов со скоростями  $4^\circ$  и  $12^\circ/\text{с}$  со стимулами со скоростями  $18^\circ$  и  $24^\circ/\text{с}$ . Красным цветом выделены значимые различия ( $p < 0.05$ ) (рис. 4).

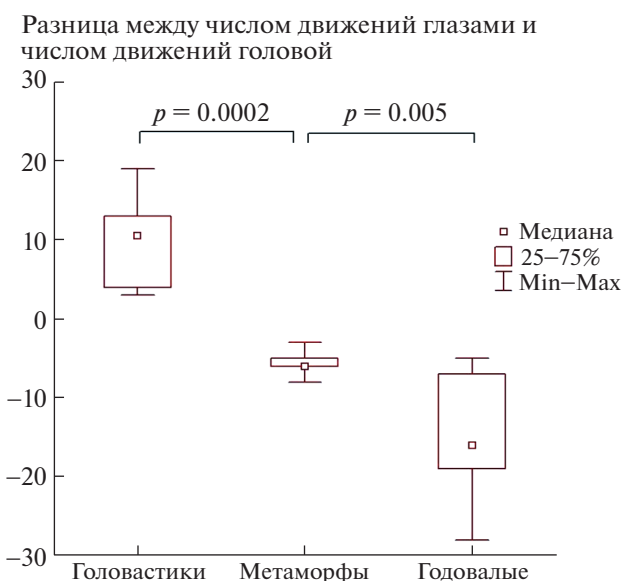
При сравнении среднего количества нистагмов головы взрослых особей в ответ на все варианты скорости движения чередующихся полос оптомоторного барабана критерий Фридмана показал наличие значимых различий ( $p = 0.00076$ ). Так, при парном сравнении критерий Вилкоксона показал, что достоверно отличаются (от реакций на остальные стимулы) только реакции на стимул со скоростью  $4$  ( $p = 0.004$ ). Реакции на стимул, движущийся со скоростями  $12^\circ$ ,  $18^\circ$  и  $24^\circ/\text{с}$ , статистически значимо не различаются ( $p = 0.5$ ). Это также подтверждается при сравнении с использовани-



**Рис. 2.** Количество движений глазами и головой в ответ на оптомоторный стимул у головастика, метаморфы и годовалых особей обыкновенной чесночницы.

ем критерия Фридмана, статистически незначимое значение  $p$  выделено черным. Красным цветом выделены значимые различия ( $p < 0.05$ ). Таким образом, реакция на стимул, движущийся со скоростью  $4^\circ/\text{с}$ , значимо отличается от каждого из остальных стимулов.

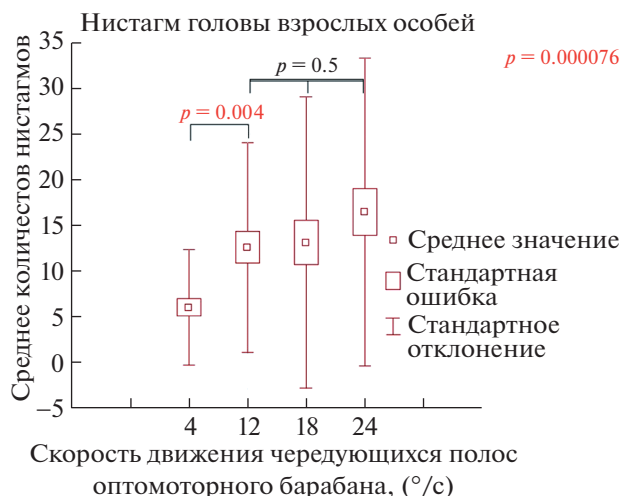
Таким образом, эффективность скоростей движения оптомоторного стимула, вызывающего



**Рис. 3.** Сравнение между числом движений глазами и головой в ответ на предлагаемый стимул в оптомоторном барабане у головастика, метаморфы и годовалых особей обыкновенной чесночницы.



**Рис. 4.** Среднее количество движений глазами у головастика в оптомоторном барабане при разных скоростях движения стимула. Ось Y – среднее количество компенсирующих движений глаз в ответ на движение оптомоторного стимула – движение чередующихся черно-белых полос размером 20 угловых градуса; ось X – четыре фиксированных скорости движения чередующихся полос оптомоторного барабана.



**Рис. 5.** Среднее количество компенсирующих движений головой в оптомоторном барабане при разных скоростях движения стимула. Ось Y – среднее количество компенсирующих движений глаз в ответ на движение оптомоторного стимула – движение чередующихся черно-белых полос размером 20 угловых градуса; ось X – четыре фиксированных скорости движения чередующихся полос оптомоторного барабана.

нистагм головы у чесночниц в возрасте один год в диапазоне 12°–24°/с, достоверно не отличалась (рис. 5).

В период метаморфоза (переход от водного к наземному образу жизни) метаморфы чесночниц реагировали на движение зрительного фона и нистагмом глаз и головы. Причем, амплитуда нистагма глаз у метаморфов была значительно ниже, чем амплитуда нистагма у головастика, а амплитуда нистагма головы у метаморфов также была значительно ниже, чем у взрослых (табл. 1).

Головастики практически всех видов бесхвостых амфибий в естественных условиях находятся в постоянном движении в поисках растительной пищи. Двигательная активность животных значительно уменьшается у источника пищи, но при этом колебания хвоста не прекращаются, что связано с необходимостью постоянного позиционирования тела. Переход в процессе метаморфоза от рыбоподобной личинки (головастика) к четвероногой особи сопровождается глубокими преобразованиями в строении организма. Постепенно появляются конечности, происходит резорбция хвоста (за счет этого животное питается), меняются ротовой аппарат и пищеварительная система. Вследствие этих и других преобразований кардинально меняется поведение. В естественных условиях после окончания метаморфоза животные располагаются у кромки воды и при опасности скрываются в воде или закапываются в песчаный грунт. Также происходит трансформация двигательного режима с хвостового (осевого) на

передвижение с помощью четырех конечностей. После окончания метаморфоза меняется среда обитания и происходит переход к хищничеству. Важно отметить, что сеголетки и взрослые бесхвостые амфибии в большинстве своем являются засадными хищниками и обычно не преследуют добычу, т.е. по сравнению с головастиками они малоподвижны.

Переход в процессе метаморфоза от рыбоподобной личинки к наземному образу жизни у бесхвостых амфибий, в числе прочего, приводит и к кардинальным изменениям системы стабилизации зрения. Результаты тестирования реакций чесночниц в оптомоторном барабане показали, что на стадии личиночного развития 36–38 головастики реагируют на движение полос оптомоторного барабана только движениями глаз. Но уже у метаморфов (лягушата с остатками хвоста) в ответ на движение полос барабана отмечались как движения глаз, так и движения головы. Обе эти поведенческие реакции отличались от таковых у головастика и выглядели как бы редуцированными с амплитудой смещения 2–5 угловых градуса. Через год после метаморфоза чесночницы при оптомоторной стимуляции реагируют только нистагмом головы амплитудой 15–18 угловых градусов. Хотя всем позвоночным животным свойственен оптокинетический рефлекс, экспериментально выявлены отличительные особенности его проявления у разных позвоночных. Млекопитающие способны компенсировать более высокие скорости движения фона, в то время как амфибии, на-

пример, не могут этого сделать. У птиц, рептилий и амфибий 80% стабилизации взгляда осуществляется за счет движений головы и движениями тела, в то время как у млекопитающих и рыб стабилизация зрения в значительной степени реализуется за счет движений глаз [8, 9]. Лягушки и жабы в ряду позвоночных занимают промежуточное положение за счет того, что в течение жизни занимают две экологические ниши — водную и наземную [10, 11]. Стабилизация зрения за счет движений глаз больше привязана к поведенческим ситуациям, когда зрительный фон перемещается с большей скоростью, т.е. для животных, ведущих более активный образ жизни за счет более высоких скоростей собственных перемещений. Головастики чесночницы компенсировали более высокие скорости движения зрительного фона по сравнению со взрослыми животными (рис. 2). Нейронные структуры, формирующие оптокинетический рефлекс у всех позвоночных, изученных до настоящего времени, выявлены в дополнительной зрительной системе (ядро базального оптического тракта) и в претектальных зрительных центрах, т.е. в стволовых отделах мозга, но у млекопитающих в систему стабилизации зрения вовлечены и корковые структуры [8, 12, 13].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Birukow G.* // *Z. Vgl. Physiol.* 1937. V. 25. P. 92–142.
2. *Chochran S.L., Dieringer N., Precht W.* // *J. Neurosci.* 1984. V. 4. P. 43–57.
3. *Dieringer N., Precht W.* // *Exp. Brain Res.* 1982. V. 47. P. 394–406.
4. *Sha Sun, Zhentao Zuo, Michelle Manxiu Ma, et al.* // bioRxiv preprint 2019.
5. *von Uckermann G., Le Ray D., Combes D., et al.* // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. P. 4253–4264.
6. *Gosner K.L.* // *Herpetologica.* 1960. V. 16. P. 183–190.
7. *Fite K.V.* // *Brain Behav. Evol.* 1985. V. 26. P. 71–90.
8. *Masseck O.A., Hoffmann K.P.* // *Ann N Y Acad Sci.* 2009. V. 1164. P. 430–439.
9. *Katte O., Hoffmann K.-P.* // *J. Comp. Physiol.* 1980. V. 140. P. 53–57.
10. *Chochran S.L., Dieringer N., Precht W.* // *J. Neurosci.* 1984. V. 4. P. 43–57.
11. *Lazar G.* 1989. Altering the direction of optokinetic head nystagmus: a lesion study and a hypothetical model. *Exp. Brain Res.* 77: 193–200.
12. *Bastakov V.A., Kiseleva E., Orlov O.Yu.* // *J. Integr. Neurosci.* 2015. V. 14. P. 491–501.

## RESTRUCTURING OF THE OPTOKINETIC REFLEX DURING METAMORPHOSIS IN *Pelobates fuscus* Laur.

E. I. Kiseleva<sup>a</sup>, O. Yu. Orlov<sup>b</sup>, and V. A. Bastakov<sup>a,b,#</sup>

<sup>a</sup> *A.N. Severtsov Institute of ecology and evolution RAS, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Institute for information transmission problems (Kharkevich Institute) RAS, Moscow, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS D.S. Pavlov

The restructuring of the gaze stabilization system in the *Pelobates fuscus* was investigated by quantitative analysis of the optomotor response using video imaging. Gaze stabilization is an important component in the system of neural mechanisms of visual depth perception. It was shown that in aquatic tadpoles of the *P. fuscus* the optomotor reaction is similar to that of fish (movement of the animal in the direction of the visual background and eye nystagmus consisting of fast and slow phases). During metamorphosis (transition from aquatic to terrestrial lifestyle), froglets of *P. fuscus* responded to the movement of the visual background by eyes and head nystagmus. One year after metamorphosis, the *P. fuscus* responded in response to movement of the visual background as adult tailless amphibians — only with head nystagmus (slow and fast phases), while eye movements were practically absent. Questions related to the causes of the loss of active eye movements by Anura amphibians in the process of evolution are discussed.

**Keywords:** optokinetic reflex, gaze stabilization, amphibians, *Pelobates fuscus*



УДК 612.017: 612.018

## РОЛЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЛИКОДЕЛИНА В ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

© 2022 г. К. Ю. Шардина<sup>1</sup>, В. П. Тимганова<sup>1</sup>, М. С. Бочкова<sup>1,2</sup>, П. В. Храмов<sup>1,2</sup>,  
М. Б. Раев<sup>1,2</sup>, С. А. Заморина<sup>1,2,\*</sup>

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым

Поступило 22.04.2022 г.

После доработки 25.05.2022 г.

Принято к публикации 27.05.2022 г.

Исследовали влияние рекомбинантного гликоделина (GdA) на уровень Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) в культуре активированных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, одновременно оценивая пролиферативный статус клеток. В исследовании применяли рекомбинантный GdA, полученный из *E. coli* и из клеток НЕК293 в концентрациях 0.2, 2 и 10 мкг/мл. Установлено, что только низкая концентрация (0.2 мкг/мл) рекомбинантного GdA бактериального происхождения снижала количество пролиферирующих CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, а также количество Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-/low</sup>) в экспериментальной системе.

**Ключевые слова:** беременность, гликоделин, дифференцировка клеток, регуляторные Т-лимфоциты

**DOI:** 10.31857/S2686738922050262

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин) — это димерный гликопротеин с молекулярной массой 42–56 кД, который был впервые выделен и идентифицирован в 1976 г. как новый антиген плаценты [1]. Известно, что амниотический вариант гликоделина (GdA) секретируется преимущественно децидуальным железистым эпителием под влиянием прогестерона, накапливаясь в амниотической жидкости и материнской сыворотке во время беременности [2]. Независимо от того что иммунодепрессивные эффекты гликоделина хорошо известны [3, 4], его роль в формировании иммунной толерантности в период беременности остается неизученной.

С точки зрения формирования толерантности при беременности, одной из ключевых является субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Дефицит этих клеток или их функциональная недостаточность связаны с осложнением или прерыванием беременности, а повышение уровня Treg ассоциировано с успешным течением беременности [5].

Известно, что GdA способен повышать уровень антигенспецифичных Treg в присутствии антигенпрезентирующих клеток [6], однако прямые эффекты этого белка на дифференцировку Т-клеток практически не изучены. Нативный и рекомбинантный GdA способны напрямую регулировать дифференцировку наивных Т-хелперов, способствуя доминированию Th2 над Th1 [8]. Реализацию эффектов GdA на уровне Т-клеток связывают с вовлечением мембранной молекулы CD45 [7].

Таким образом, целью данной работы являлось изучение роли рекомбинантного GdA в регуляции дифференцировки Treg в модели *in vitro*. В рамках поставленной цели решались две задачи — изучение влияния двух различных по гликозилированию форм рекомбинантного гликоделина, а также изучение пролиферативного статуса клеток в эксперименте.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось согласно Хельсинкской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и био-медицине 1999 г., получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 1.03.2022.

Объекты исследования. Образцы венозной крови были взяты у здоровых доноров (небеременные женщины,  $n = 5$ , возраст 25–39 лет) путем

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

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

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

венопункции. Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности диаколл-верографина (Diacoll 1077, “Dia-M”, Россия,  $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ ). Монокультуры  $\text{CD4}^+$ -клеток (Т-хелперы) получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием магнитных частиц MACS® MicroBeads (“Miltenyi Biotec”, Германия). Чистота выделения Т-хелперов составила  $96.7 \pm 1.7\%$ .

В работе использовали два вида рекомбинантного гликоделина: GdA [продукт *E. coli*, 22.4 кДа] и mGdA [продукт НЕК-239м, 23.9 кДа], (“MyBioSource. Inc.”, США) в концентрациях 0.2 и 2 мкг/мл, соответствующих его уровню в периферической крови женщины при физиологической беременности (0.2 мкг/мл – I и III триместры; 2 мкг/мл – II триместр), а также 10 мкг/мл, соответствующей его концентрации в амниотической жидкости (I триместр) и тканях эндометрия [9]. В препаратах гликоделина оценивали концентрацию эндотоксина (ЛПС) с помощью ЛАЛ-теста (“Thermo Scientific”, США). Концентрация эндотоксина в препаратах гликоделина была  $>0.5 \text{ EU/мл}$ , поэтому в среду культивирования клеток добавляли полимиксин В (Sigma, США) для подавления действия ЛПС. Полученные монокультуры Т-хелперов в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток инкубировали в 96-луночном планшете в полной питательной среде (RPMI-1640 (Sigma Aldrich, США), 10% FBS (“BI”, Израиль), 10 мМ Нерес (“ICN Ph.”, США), 2 мМ L-глутамин (“ICN Ph.”, США), 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (“BI”, Израиль)) и 30 мкг/мл полимиксина В с активационными частицами (#130-091-441, “Miltenyi Biotec”, Германия), содержащими антитела против CD2, CD3, CD28 и цитокинами TGF- $\beta$  (5 нг/мл) и IL-2 (166 нг/мл) (“Miltenyi Biotec”, Германия). Концентрации цитокинов были определены исходя из информации об их биологической активности, предложенной на сайте производителя. После внесения гликоделина клетки культивировали 72 ч при 5%  $\text{CO}_2$  и 37°C.

После культивирования производили окрашивание клеток с использованием панели идентификации Treg (#362251, “Biolegend”, США). В панель входят витальный краситель 7-AAD и антитела к поверхностным антигенам (APC-CD25, APC/Cyanine7-CD3, PE/Cyanine7-CD127 (IL-7R $\alpha$ ), FITC-CD4). Тактика гейтирования включала в себя следующие этапы: на графике FSC/SSC выделяли общий пул лимфоцитов, затем живые Т-лимфоциты (7-AAD-CD3 $^+$ ), из них гейтировали Т-хелперы (CD4 $^+$ ), внутри популяции которых оценивали процент Treg (CD25 $^{\text{high}}$ -CD127 $^{-/\text{low}}$ ) (рис. 1А). Итоговый фенотип Treg: 7-AAD-CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ CD127 $^{-/\text{low}}$ . Измерения

проводили на проточном цитофлуориметре CytoFlex S (“Beckman Coulter”, США).

Для оценки пролиферативного статуса использовали метод дифференциального гейтирования на графике светорассеяния по размеру и гранулярности клеток. Так, после 72 ч культивирования активированные CD4 $^+$ -клетки были представлены тремя популяциями: неделящиеся клетки в характерном для них регионе, пролиферирующие клетки, образующие смещение вправо и вверх и апоптозирующие клетки. Количество клеток внутри каждой популяции выражали в процентах от общего количества клеток [9]. Далее файлы данных были обработаны в программе “KALUZA Analysis Software” (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку полученных результатов данных проводили в программе GraphPad Prism 6 при помощи критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1–Q3)). Различия считались достоверными при  $p < 0.05$ .

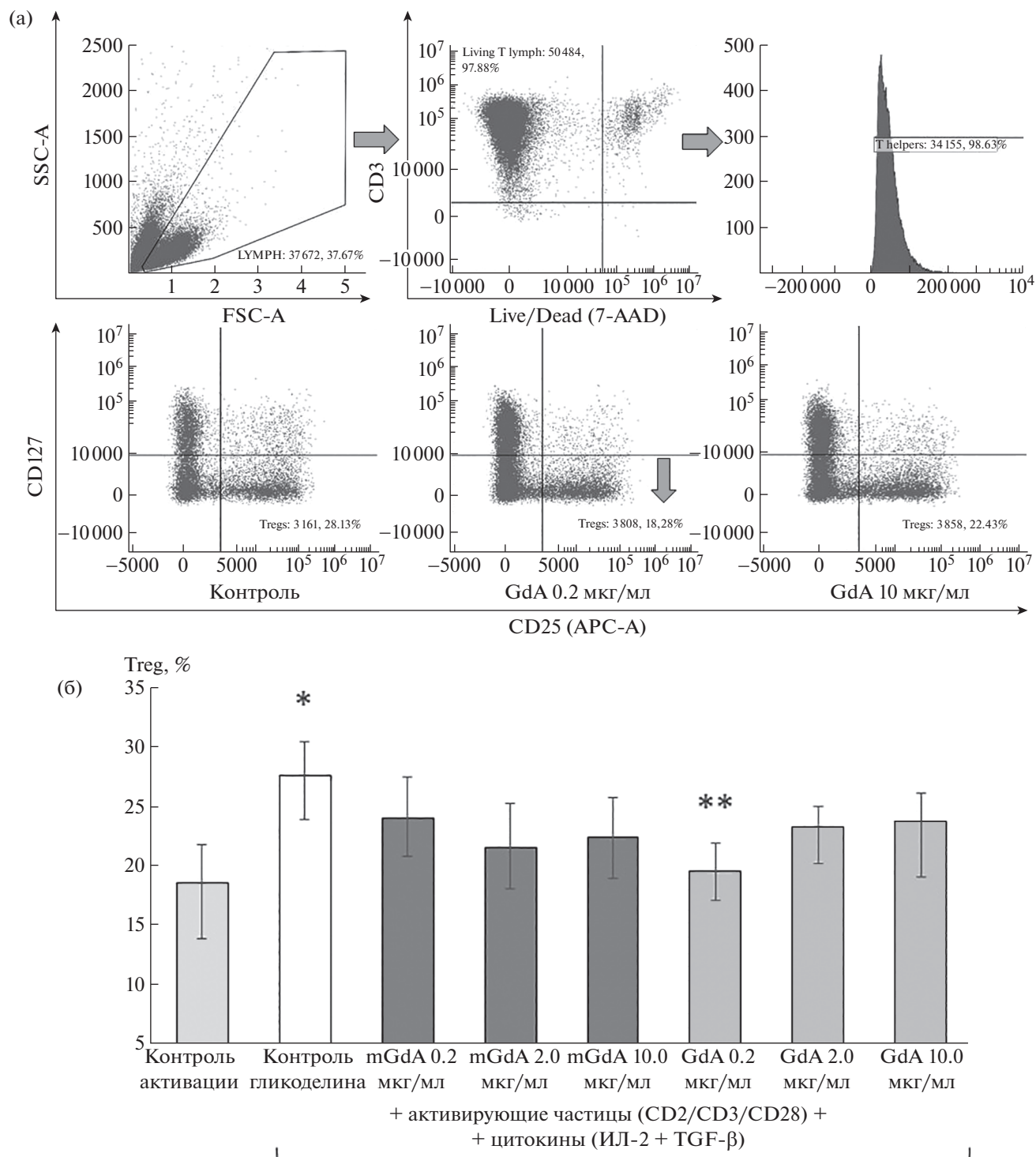
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что присутствие в культурах активационных частиц, нагруженных антителами против CD2/CD3/CD28, а также цитокинов TGF- $\beta$  и IL-2, приводило к существенному повышению уровня Treg в культурах Т-хелперов, что свидетельствует об адекватности экспериментальной системы (рис. 1 а, б).

При изучении влияния GdA на дифференцировку Treg установлено, что данный белок, вне зависимости от источника получения, практически не оказывал достоверного влияния на уровень CD4 $^+$ CD25 $^{\text{high}}$ CD127 $^{-/\text{low}}$  в монокультуре Т-хелперов. Однако низкая концентрация рекомбинантного гликоделина бактериального происхождения (GdA 0.2 мкг/мл) вызывала снижение уровня Treg в культурах клеток (рис. 1 б).

Учитывая тот факт, что процессы пролиферации и дифференцировки тесно связаны, мы оценили пролиферативный статус Т-хелперов в культуре клеток. Показано, что GdA практически не оказывал эффекта на распределение клеток по пролиферативному статусу, за исключением низкой концентрации рекомбинантного гликоделина бактериального происхождения (GdA 0.2 мкг/мл), которая снижала количество пролиферирующих клеток, одновременно повышая количество не пролиферирующих клеток. Таким образом, низкая концентрация GdA угнетала пролиферацию активированных Т-хелперов, и за счет этого эффекта снижалось количество Treg в данной экспериментальной модели (рис. 2).

Важно отметить, что достоверный эффект оказывала только низкая концентрация рекомби-



**Рис. 1.** Влияние гликоделина на уровень Treg (CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) в культуре изолированных Т-хелперов. А) Показаны гистограммы гейтирования Treg и результаты одного эксперимента, контроль без гликоделина; Б) Результаты серии экспериментов (Me (Q1–Q3), n = 5).

Примечание: здесь и в рис. 2, \* p < 0.05 – достоверные по w-критерию Вилкоксона различия между контролем без активаторов и контролем с активатором, \*\*p < 0.05 – между контролем с активатором и пробами с гликоделином. Контроль активации – пробы без активирующих частиц и цитокинов, контроль гликоделина – пробы без гликоделина.

нантного гликоделина, что может объясняться его способностью регулировать экспрессию своего предположительного рецептора – CD45 [7].

По-видимому, высокие концентрации белка не вызывают достоверных эффектов из-за рефрактерного состояния клеток, связанного с переиз-

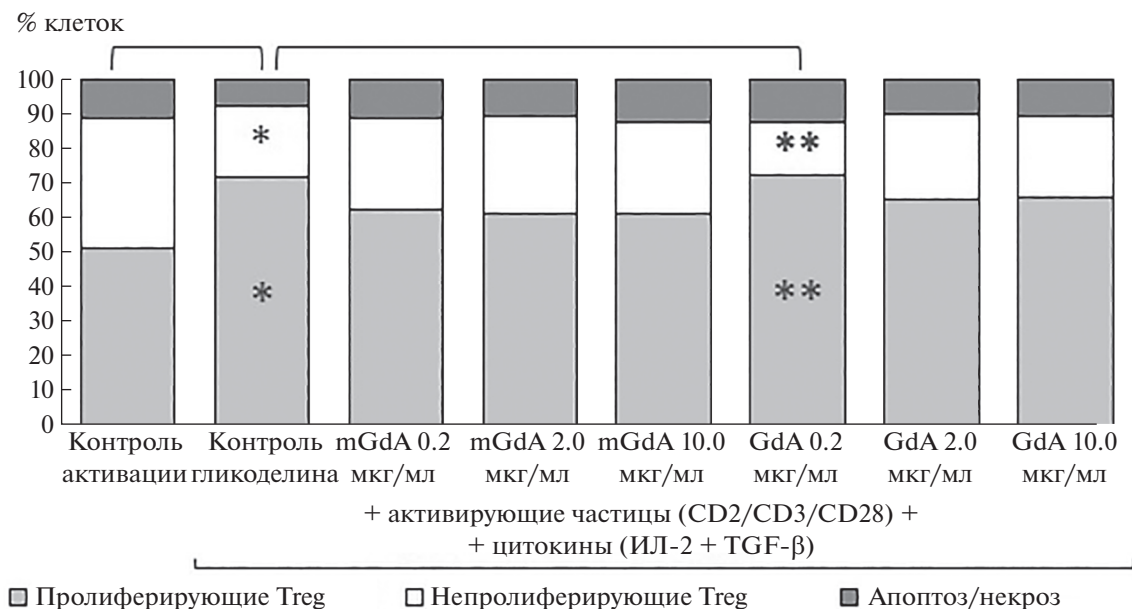


Рис. 2. Влияние гликоделина на пролиферативный статус Т-хелперов (М, n = 5).

бытком сигнала. Стоит также отметить, что гликозилированный рекомбинантный mGdA, полученный в клетках млекопитающих НЕК293, не оказывал достоверных эффектов на пролиферацию и дифференцировку Treg.

В целом выявленный угнетающий эффект гликоделина является довольно неожиданным, поскольку для успешного течения беременности необходимо повышение уровня Treg [10]. В то же время гликозилированный гликоделин, который близок по своей структуре нативному, не оказывал достоверных эффектов на дифференцировку Treg. Стоит отметить, что ранее мы показали, что альфа-фетопротеин способен подавлять дифференцировку Treg *in vitro* [11]. Известно, что хорионический гонадотропин [12] и трофобластический гликопротеин [13] повышают количество Treg в культуре, а также усиливают функциональную активность этих клеток. По-видимому, белки, ассоциированные с беременностью, оказывая по отдельности разнонаправленные эффекты, в совокупности формируют вектор иммунной толерантности.

Таким образом, было показано, что только низкая концентрация (0.2 мкг/мл) рекомбинантного GdA бактериального происхождения снижала количество Treg в экспериментальной системе *in vitro*. В то же время рекомбинантный mGdA, полученный в клетках млекопитающих НЕК293, не оказывал достоверных эффектов на дифференцировку Treg. В целом мы впервые продемонстрировали прямые эффекты рекомбинантного гликоделина на дифференцировку Treg.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 19-29-04055 мк и в рамках государственного задания: АААА-А19–119112290007-7.

В работе использовано оборудование ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tatarinov Yu.S. Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein, placental-specific alpha-1- and alpha-2-microglobulins. // In: *Pregnancy Proteins: Biology, Chemistry and Clinical Application*. London. 1982. 463 p.
2. Posiseeva L.P., Gerasimov A.M., Petrova U.L. // *Problemy Reproduktsii (Russian Journal of Human Reproduction)*. 2020. V. 26. № 3. P. 1–22.
3. Cui J., Liu Y., Wang X. // *Frontier Immunology*. 2017. V. 8. P. 1685.
4. Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khrantsov P.V., Rayev M.B. // *Medical Immunology (Russia)*. 2019. V. 21. № 4. P. 603–616.
5. Figueiredo A.S., Schumacher A. // *Immunology*. 2016. V. 148. № 1. P. 13–21.
6. Ochanuna Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. P. e12868.
7. Rachmilewitz J., Borovsky Z., Riely G.J., Miller R., Tykocinski M.L. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 14059–14065.
8. Mishan-Eisenberg G., Borovsky Z., Weber M.C., Gazit R., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. // *J. Immunol.* 2004. V. 173. P. 5524–5530.
9. Haltunen M., Kämäräinen M., Koistinen H. Glycodelin: a reproduction-related lipocalin // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1482. P. 149–156.

10. Vesela R., Dolezalova L., Pytlik R., Rychtrmocova H., Mareckova H., Trneny M. // Cellular Immunology. 2011. V. 271. P. 78–84.
11. Chereshev V.A., Timganova V.P., Zamorina S.A., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Kropaneva M.D., Raev M.B. // Dokl. Biol. Sci. 2017. V. 477. № 1. P. 248–251.
12. Martínez F.F., Knubel C.P., Sánchez M.C., Cervi L., Motrán C.C. // Eur. J. Immunol. 2012. V. 42. № 6. P. 1573–1584.
13. Poloski E., Oettel A., Ehrentaut S., Luley L., Costa S.D., Zenclussen A.C., Schumacher A. // Biol. Reprod. 2016. V. 94. № 5. P. 106.

## THE ROLE OF RECOMBINANT GLYCODELIN IN THE DIFFERENTIATION OF REGULATORY T-LYMPHOCYTES

**K. Yu. Shardina<sup>a</sup>, V. P. Timganova<sup>a</sup>, M. S. Bochkova<sup>a,b</sup>, P. V. Khramtsov<sup>a,b</sup>,  
M. B. Rayev<sup>a,b</sup>, and S. A. Zamorina<sup>a,b,#</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (“IEGM UB RAS”) – a branch of the Federal State Budgetary Institution of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

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

#e-mail: zamorina.sa@gmail.com

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev

We studied the effect of recombinant glycodelin (GdA) on the level of T-regulatory lymphocytes (Treg) in a culture of activated CD4<sup>+</sup> lymphocytes, while simultaneously assessing the proliferative status of cells. The study used recombinant GdA derived from *E. coli* and from HEK293 cells at concentrations of 0.2; 2 and 10 µg/mL. It was found that only a low concentration (0.2 µg/mL) of recombinant GdA of microbial origin reduced the number of proliferating CD4<sup>+</sup> lymphocytes, as well as the number of Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) in the experimental system in vitro.

*Keywords:* cells differentiation, glycodelin, pregnancy, regulatory T-lymphocytes

УДК 574.21: 574.633: 574.522

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ПЛУТОНИЯ И РАДИОЦЕЗИЯ В МЫШЦАХ РЫБ р. ЕНИСЕЙ

© 2022 г. Т. А. Зотина<sup>1,3,\*</sup>, М. С. Мельгунов<sup>2</sup>, Д. В. Дементьев<sup>1</sup>, Ю. В. Александрова<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи

Поступило 20.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принято к публикации 20.05.2022 г.

В работе получены первые данные по содержанию плутония ( $^{239+240}\text{Pu}$ ) в мышцах обыкновенной щуки (*Esox lucius*) и сибирского ельца (*Leuciscus baicalensis*), обитающих в среднем течении р. Енисей вблизи места поступления в реку радиоактивных сбросов Горно-химического комбината. Отмечено возрастание содержания  $^{239+240}\text{Pu}$  и радиоцезия ( $^{137}\text{Cs}$ ) в мышцах щуки вслед за увеличением объема контролируемых сбросов этих радионуклидов в 2018 г. Содержание  $^{239+240}\text{Pu}$  в мышцах щуки (2–11 мБк/кг сух. веса) и ельца (1–4 мБк/кг сух. веса) р. Енисей попадает в диапазон величин, полученных другими авторами для ихтиофауны из водоемов, загрязненных сбросами АЭС и предприятий по переработке отработавшего ядерного топлива. Отношение удельных активностей  $^{239+240}\text{Pu}/^{137}\text{Cs}$  в мышцах рыб по сравнению с аналогичным соотношением в других гидробионтах свидетельствует о значительно более низкой биологической доступности плутония для рыб.

**Ключевые слова:** радионуклиды, щука, елец, биомагнификация, биоиндикатор

**DOI:** 10.31857/S268673892205033X

Плутоний ( $^{238}\text{Pu}$ ,  $^{239+240}\text{Pu}$ ) поступает в р. Енисей в составе контролируемых радиоактивных сбросов Горно-химического комбината (ГХК). Изотопы плутония в силу большого периода полураспада (87.7 лет для  $^{238}\text{Pu}$ ,  $2.41 \times 10^4$  лет для  $^{239}\text{Pu}$  и  $6.54 \times 10^3$  лет для  $^{240}\text{Pu}$ ) накапливаются в экосистеме со временем и могут представлять опасность для биоты в долгосрочной перспективе как источник  $\alpha$ -излучения. Недавние исследования показали, что содержание плутония в донных отложениях, представителях макрофитной растительности и зообентоса р. Енисей, возросло в ответ на увеличение сбросов плутония в реку [1, 2]. Биологически доступный плутоний способен переноситься в водных трофических сетях. Известно, что плутоний видоспецифично накапливается в тканях и органах морских и пресноводных рыб [3–7]. В настоящее время нет опубликованных данных по содержанию плутония в предста-

вителях ихтиофауны р. Енисей, несмотря на имеющиеся результаты оценки дозовой нагрузки для рыб [8]. Чтобы восполнить этот пробел, в данной работе мы оценивали содержание плутония в мышцах массовых промысловых рыб р. Енисей в период до и после увеличения контролируемых сбросов плутония. Данные результаты необходимы для сравнительной оценки индикаторного потенциала видов промысловых рыб и оценки относительной биодоступности плутония и радиоцезия для рыб, отличающихся типом питания.

Для исследования использовали щуку обыкновенную (*Esox lucius*) – представителя рыбацких рыб, и ельца сибирского (*Leuciscus baicalensis*) – представителя всеядных рыб. Визуальный анализ содержимого желудков щук показал, что елец входит в спектр питания щуки. Елец и щука относятся к числу массовых промысловых видов на среднем участке Енисея. Отлов рыб производился в р. Енисей вблизи с. Большой Балчуг (участок 2, рис. 1). Участок отлова рыб расположен на 90–95 км ниже по течению г. Красноярск и на 10–15 км ниже места радиоактивных сбросов ГХК. Фоновый участок отлова располагался на 100 км выше места поступления радиоактивных сбросов в р. Енисей, вблизи с. Овсянка (участок 1, рис. 1). Рыбы получены из уловов местных рыбаков. Пробы мышц, снятые с осевого скелета рыб, сушили и озоляли, как описано ранее [9, 10]. В одну пробу объединяли мышцы от 18–72 ельцов, от-

<sup>1</sup> Институт биофизики, Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> Институт геологии и минералогии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

\*e-mail: t\_zotina@ibp.ru



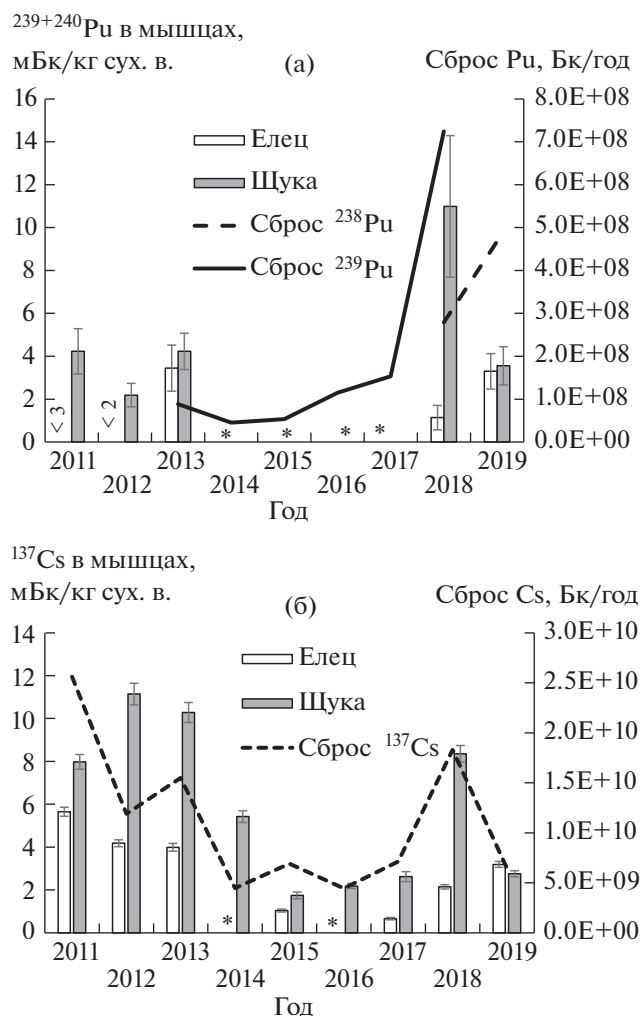
**Рис. 1.** Карта отрезка р. Енисей с указанием мест отлова рыб: 1 – место отбора фоновых проб, 2 – место отлова рыб, расположенное на расстоянии около 15–20 км ниже радиоактивных сбросов Горно-химического комбината (ГХК). Для создания рисунка был использован фрагмент космического снимка из GoogleEarth.

ловленных в одну дату. Мышцы щук объединяли в одну пробу в 2011–2014 гг. по 4–7 особей на пробу, с 2015 г. мышцы щук анализировали индивидуально. Сырой вес тел щуки составлял 0.24–2.51 кг, ельца – 0.044–0.116 кг. Содержание  $\gamma$ -излучающих радионуклидов в пробах золы мышц измеряли с помощью гамма-спектрометра с полупроводниковым германиевым детектором GX2320 (Canberra), как описано ранее [9], в ИБФ СО РАН (Красноярск). Удельные активности рассчитывали на дату вылова рыб. Для анализа использовали только величины, превышающие предел обнаружения. Плутоний экстрагировали из проб золы растворителем и выделяли с помощью ионообменной смолы, как описано ранее [2]. Выделенный плутоний осаждали электролитически на мишень из нержавеющей стали. Содержание изотопов плутония ( $^{239+240}\text{Pu}$ ,  $^{238}\text{Pu}$ ) измеряли на 8-канальном альфа-спектрометре ALPHA-ENSEMBLE-8-RM с низкофоновыми кремниевыми детекторами ENS-U300 (Ametek, “ORTEC”) в ЦКП многоэлементных и изотопных исследований СО РАН (Новосибирск). Предел обнаружения изотопов плутония составлял 0.001 Бк. Удельные активности радионуклидов в пробах мышц приведены в Бк/кг сухого веса. В качестве ошибок результатов указаны погрешности измерения (стандартные отклонения), рассчитанные для случайных событий, описываемых распределением Пуассона как квадратный корень из среднего числа зарегистрированных импульсов.

Согласно опубликованным данным в исследованный нами период времени произошли изменения в производственной деятельности ГХК, что повлекло за собой возрастание ежегодных разрешенных сбросов плутония в открытую гид-

рографическую сеть [11]. Наиболее сильное увеличение сбросов плутония произошло в 2018 г., в 4.7 раза по сравнению с предыдущим годом для  $^{239+240}\text{Pu}$ . Данные о сбросах  $^{238}\text{Pu}$  приведены в отчетах только в 2018 и 2019 гг. (рис. 2а). Данные о сбросе  $^{239+240}\text{Pu}$  в 2019–2020 г. в ежегодных отчетах не представлены. В исследованные нами годы содержание  $^{239+240}\text{Pu}$  в пробах мышц ельца составляло 1–4 мБк/кг сух. веса, возрастания содержания плутония в пробах ельца после увеличения объема сбросов этого радионуклида не отмечено (рис. 2а). Содержание  $^{239+240}\text{Pu}$  в мышцах щуки варьировалось в диапазоне 2–11 мБк/кг сух. веса. Максимальная величина, в 2.7–5.5 раза превышающая содержание плутония в другие годы, зарегистрирована в 2018 г. Следует отметить, что в 2018 г. была проанализирована самая крупная щука, весом 2.5 кг, возрастом не менее 7 лет, тогда как вес щук в других выборках не превышал 1.7 кг. Следовательно, в дальнейшей работе следует проверить наличие положительной зависимости между содержанием плутония в мышцах и размерно-весовыми характеристиками щук. Содержание  $^{238}\text{Pu}$  в мышцах рыб не превышало пределов обнаружения этого изотопа.

Содержание изотопов плутония в мышцах рыб с фонового участка р. Енисей не превышало пределов обнаружения, равно как и содержание радиоцезия. Анализ литературы показал, что удельные активности плутония в мышцах щуки и ельца из р. Енисей сопоставимы с величинами, зарегистрированными в мышцах морских и пресноводных рыб, обитающих вблизи радиоактивных сбросов предприятий ядерной промышленности [12, 13]. Например, в мышцах рыб из р. Рона (Rhône River), обитающих вблизи сбросов предприятия по переработке отработавшего ядерного топлива, содержание  $^{239+240}\text{Pu}$  составляло 2–7 мБк/кг сух. веса [12], а в мышцах средиземноморских рыб вблизи АЭС Ванделлос (Vandellós NPP) – 7–31 мБк/кг сух. веса [13]. В целом следует отметить, что опубликованные данные по содержанию плутония в мышцах пресноводных рыб немногочисленны. Из публикаций известно, что содержание плутония в разных органах и тканях рыб может значительно различаться. Так, удельная активность плутония в мышцах рыб значительно ниже, чем в печени, гонадах и костях [3–7]. Например, удельная активность плутония в печени рыб из водоемов зоны отчуждения Чернобыльской АЭС на 1–3 порядка выше, чем в мышцах этих рыб [5], содержание плутония в печени морских рыб в 5–1000 раз превышает содержание в мышцах [3, 6, 7]. Также известно, что, помимо печени, плутоний имеет большее сродство к костным тканям, чем к мышечным, поэтому его удельная активность в костях рыб выше, чем в мышцах [3, 7]. Следовательно, при оценке дозовой нагрузки для ихтио-



**Рис. 2.** Содержание плутония,  $^{239+240}\text{Pu}$ , (а) и радиоцезия,  $^{137}\text{Cs}$ , (б) в мышцах ельца и щуки р. Енисей (гистограммы, Бк/кг сух. массы) и в ежегодных сбросах (графики, Бк/год). В отмеченные звездочками годы анализ проб не производился.

фауны и прогнозировании отдаленных биологических эффектов следует учитывать особенности накопления плутония в органах и тканях рыб.

Из гамма-излучающих техногенных радионуклидов в пробах мышц щуки и ельца, отловленных вблизи точки радиоактивных сбросов, зарегистрирован только радиоцезий ( $^{137}\text{Cs}$ ). В исследованный в настоящей работе период наблюдалось снижение сбросов  $^{137}\text{Cs}$  в Енисей с 2011 по 2014 г., а в 2018 г. произошло увеличение сбросов, аналогично увеличению сбросов плутония (рис. 2б). В 2018 г. отмечено возрастание содержания радиоцезия в мышцах щуки в 3.2 раза по сравнению с предыдущим годом и в 3.8 раза относительно предшествовавшего трехлетнего периода с низким уровнем сбросов цезия (рис. 2б), что согласуется с магнитудой возрастания активности цезия, поступившей в 2018 г. в Енисей со сбросами, в 2.6 и 3 раз соответственно. Временные тренды содер-

жания радиоцезия в мышцах рыб в целом согласуются с динамикой ежегодных сбросов этого радионуклида в Енисей, однако, статистически значимой корреляции между сбросами и содержанием радиоцезия в мышцах рыб выявить не удалось ( $R = 0.64$ ,  $p = 0.119$ ,  $n = 9$  для щуки;  $R = 0.70$ ;  $p = 0.079$ ,  $n = 7$  для ельца). Корреляционный анализ также не выявил статистически значимой зависимости между содержанием радиоцезия в мышцах ельца и мышцах щуки ( $R = 0.68$ ,  $p = 0.089$ ,  $n = 7$ ), несмотря на схожие тренды.

Плутоний и радиоцезий, содержащиеся в мышцах рыб, представляют собой биологически доступную форму этих радионуклидов, которая ассимилировалась в мышцах из воды и/или пищи, и может быть перенесена в организмы потребителей рыбы. Сравнение с другими гидробионтами р. Енисей показало, что удельные активности  $^{239+240}\text{Pu}$  (1–11 мБк/кг) в мышцах рыб были



значительно ниже, чем в биомассе двух видов макрофитов (84–25915 мБк/кг), накапливающих радионуклиды из воды, и телах амфипод (96–7551 мБк/кг), получающих радионуклиды преимущественно из пищи [2]. Отношение удельных активностей  $^{239+240}\text{Pu}/^{137}\text{Cs}$  в мышцах щуки и ельца варьировались в диапазоне 0.0002–0.0013, что на 1–3 порядка ниже соотношения активностей этих изотопов в ежегодных сбросах ГХК (0.006–0.040), а также в других представителях биоты Енисея (0.011–0.719 в водном мхе, 0.004–0.211 в рдесте блестящем, 0.006–0.66 в амфиподах) [2]. Это свидетельствует о значительно более низкой эффективности накопления плутония в мышцах рыб по сравнению с радиоцезием, что согласуется с существующими представлениями о специфике биоаккумуляции этих радионуклидов в органах и тканях рыб [4, 14].

Содержание цезия в мышцах щук в 2011–2018 гг. в 1.4–4 раз превышало содержание цезия в мышцах ельца, что, вероятно, свидетельствует о биомагнификации радиоцезия в терминальном звене трофической цепи р. Енисей. Биомагнификация цезия в пресноводной трофической цепи – известное явление в радиоэкологии [9, 15], чего нельзя сказать о плутонии. Содержание плутония в мышцах енисейской щуки в 1.1–9.6 раза превышало содержание плутония в мышцах ельца, однако, для подтверждения биомагнификации плутония в пищевой цепи, необходимо собрать больше натуральных данных.

Таким образом, в данной работе впервые оценено содержание плутония в съедобных мышечных тканях обыкновенной щуки и сибирского ельца, обитающих в среднем течении Енисея вблизи места поступления в реку радиоактивных сбросов. Удельные активности плутония в мышцах рыб попадают в диапазон величин, полученных другими авторами для ихтиофауны из водоемов, загрязненных радиоактивными сбросами АЭС и предприятий по переработке отработавшего ядерного топлива. Соотношение удельных активностей плутония и радиоцезия в мышцах рыб по сравнению с аналогичным соотношением в других гидробионтах свидетельствует о более низкой биологической доступности плутония для рыб. На основании полученных предварительных результатов обыкновенную щуку можно рассматривать как более перспективный, по сравнению с сибирским ельцом, индикатор биологически доступного плутония в р. Енисей. Полученные в данной работе результаты могут быть использованы для оценки отдаленных биологических эффектов у рыб, а также для разработки мер реабилитации загрязненных участков реки.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят П.Ю. Андрущенко (ИБФ СО РАН) за помощь при подготовке проб.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии известных им конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Грант РФФИ и Правительства Красноярского края совместно с Красноярским краевым Фондом поддержки научной и научно-технической деятельности № 20-44-240004; госзадание ИБФ СО РАН и ИГМ СО РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зотина Т.А., Мельгунов М.С., Дементьев Д.В. и др. // Доклады Российской академии наук. Науки о Земле. 2020. Т. 492. № 2. С. 53–55.
2. Zotina T.A., Melgunov M.S., Dementyev D.V., et al. // J. Environ. Radioactiv. 2021. V. 237. P. 106723.
3. Skwarzec B., Struminska D.I., Borylo A. // J. Environ. Radioactiv. 2001. V. 55 (2). P. 167–78.
4. Ikaheimonen T.K., Saxen R. // Boreal Environment Research. 2002. V. 7. P. 99–104.
5. Lerebours A., Gudkov D., Nagorskaya L., et al. // Environ. Sci. Technol. 2018. V. 52 (16). P. 9442–9450.
6. Johansen M.P., Child D.P., Cresswell T., et al. // Sci. Total Environ. 2019. V. 691. P. 572–583.
7. Kim S.H., Lee H.M., Hong G.H., et al. // J. Environ. Radioactiv. 2020. V. 217. P. 106191.
8. Бурякова А.А., Крышев И.И., Сазыкина Т.Г. и др. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т. 60 (6). С. 661–670.
9. Zotina T.A., Trofimova E.A., Dementyev D.V. // J. Environ. Radioactiv. 2019. V. 208–209. P. 106028.
10. Зотина Т.А., Трофимова Е.А., Дементьев Д.В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59 (3). С. 321–328.
11. Шершаков В.М., Булгаков В.Г., Крышев И.И. и др. (ред.) Радиационная обстановка на территории России и сопредельных государств в 2010–2020 году. Ежегодник. Обнинск: НПО “Тайфун”, 2011–2021.
12. Eyrolle F., Claval D., Gontier G., et al. // J. Environ. Monit. 2008. V. 10. P. 800–811.
13. Sanchez-Cabeza J.A., Molero J. // J. Environ. Radioactiv. 2000. V. 51 (2). P. 211–228.
14. Johansen M.P., Child D.P., Cresswell T., et al. // Sci. Total Environ. 2019. V. 15 (691). P. 572–583.
15. Pinder J.E. 3rd, Hinton T.G., Taylor B.E., et al. // J. Environ. Radioactiv. 2011. V. 102. P. 283–293.

## COMPARATIVE STUDY OF PLUTONIUM AND RADIOCESIUM IN MUSCLE OF FISH OF THE YENISEI RIVER

T. A. Zotina<sup>a,c,#</sup>, M. S. Melgunov<sup>b</sup>, D. V. Dementyev<sup>a</sup>, and Yu. V. Alexandrova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biophysics, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Geology and Mineralogy, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: t\_zotina@ibp.ru

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendzhi

In this work, the first data on the content of plutonium ( $^{239+240}\text{Pu}$ ) in the muscle tissues of the Northern pike (*Esox lucius*) and Siberian dace (*Leuciscus leuciscus baicalensis*) inhabiting the middle reaches of the Yenisei River in the vicinity of the radioactive discharge site, were obtained. An increase in the content of  $^{239+240}\text{Pu}$  and radiocesium ( $^{137}\text{Cs}$ ) in pike muscles followed an increase in the volume of controlled discharges of these radionuclides to the Yenisei in 2018. The content of  $^{239+240}\text{Pu}$  in the muscles of pike (2–11 mBq/kg dry weight) and dace (1–4 mBq/kg dry weight) of the Yenisei fall within the range of values obtained by other authors for the ichthyofauna from water bodies contaminated with radioactive discharges from nuclear power plants and spent nuclear fuel processing plants. The ratio of the activity concentrations  $^{239+240}\text{Pu}/^{137}\text{Cs}$  in fish muscles, compared with the similar ratios in other hydrobionts, indicates a significantly lower bioavailability of plutonium for fish. The obtained preliminary results make it possible to consider the Northern pike as a more prospective indicator of biologically available plutonium in the Yenisei than the dace.

**Keywords:** radionuclide, Northern pike, Siberian dace, bioindicator, biomagnification

УДК 612.821.6

## МЕТИЛОБОГАЩЕННАЯ ДИЕТА МАТЕРИ ПОВЫШАЕТ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИЙ ТОНУС МЕЗОЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА У ВЗРОСЛОГО ПОТОМСТВА КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ

© 2022 г. К. Ю. Саркисова<sup>1,\*</sup>, Е. А. Федосова<sup>1</sup>, А. Б. Шацкова<sup>1</sup>, В. Б. Наркевич<sup>2</sup>, В. С. Кудрин<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН М.В. Угрюмовым

Поступило 18.05.2022 г.

После доработки 09.06.2022 г.

Принято к публикации 10.06.2022 г.

Цель работы – выяснить, влияет ли метилобогатая диета матери на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Впервые показано, что метилобогатая диета матери (холин, бетаин, фолиевая кислота, витамин B12, L-метионин, цинк) во время перинатального периода повышает дофаминергический тонус мезолимбической системы мозга у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, что сопровождается подавлением симптомов наследственной абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии. Результаты свидетельствуют о том, что метилобогатая диета матери во время перинатального периода может служить новой терапевтической стратегией предотвращения развития гипофункции мезолимбической дофаминергической системы мозга и ассоциированной с ней наследственной абсанс-эпилепсии и коморбидной депрессии у потомства.

*Ключевые слова:* абсанс-эпилепсия, коморбидная депрессия, генетическая модель, метилобогатая диета матери, потомство, моноамины мозга

DOI: 10.31857/S2686738922050250

Крысы линии WAG/Rij являются валидной моделью детской абсансной эпилепсии (АЭ) и коморбидной депрессии [1]. АЭ – неконвульсивная форма генерализованной эпилепсии, характеризующейся спонтанными пик-волновыми разрядами (ПВР) на ЭЭГ, которые сопровождаются внезапным прерыванием текущей активности и отключением сознания (отсутствие реагирования на внешние стимулы) [2]. Предыдущие нейробиохимические [3] и фармакологические [4] исследования показали, что симптомы коморбидной депрессии у крыс линии WAG/Rij связаны с пониженным содержанием дофамина (ДА) в прилежащем ядре, что указывает на пониженный тонус мезолимбической DAергической системы мозга. Дисфункция DAергической системы мозга у крыс линии WAG/Rij возникает в возрасте 2–3 мес, когда появляются первые симптомы АЭ и комор-

бидной депрессии. С возрастом, по мере нарастания гипофункции DAергической системы мозга, симптомы АЭ и коморбидной депрессии усугубляются [3]. Имеются доказательства того, что пониженный DAергический тонус играет важную роль также в патогенезе АЭ [5]. Примечательно, что изменения в DAергической системе мозга предшествуют возникновению как АЭ [5], так и коморбидной депрессии [3], указывая на важную роль DAергической системы в патогенезе обеих патологий.

Хотя АЭ и коморбидная депрессия у крыс линии WAG/Rij генетически обусловлены, наши предшествующие данные показали, что этот патологический фенотип может корректироваться эпигенетически, например, под влиянием усиленной материнской заботы [6]. Ранее нами было обнаружено, что другой эпигенетический фактор, такой как метилобогатая диета (МОД) матери во время перинатального периода, подавляет проявление АЭ и коморбидной депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij [7]. Используемая нами диета содержала компонентом одноуглеродного цикла, конечным продуктом которого является S-аденозилметионин (SAME) [8]. SAME является универсальным донором метильных групп, необходимых для метили-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

\*e-mail: karine.online@yandex.ru

рования ДНК, — одного из наиболее изученных эпигенетических механизмов, которые изменяют экспрессию генов без изменения последовательности ДНК. Предполагалось, что МОД матери на ранних стадиях развития приведет к активации процесса метилирования ДНК и, как следствие, к изменению экспрессии генов у потомства крыс линии WAG/Rij. Пилотные исследования показали, что МОД матери повышает у потомства крыс линии WAG/Rij экспрессию генов, патогенетически значимых для АЭ и коморбидной депрессии: гена ионных каналов HCN1 в соматосенсорной коре (область генерации ПВР) и гена тирозингидроксилазы — фермента, лимитирующего скорость синтеза ДА, в прилежащем ядре [9]. Известно, что SAMe влияет не только на метилирование ДНК, но как кофактор вовлечен в синтез многих нейромедиаторов в мозге — ДА, норадреналина (НА), серотонина (5-ОТ), с недостаточностью которых связано возникновение депрессивных расстройств [8]. В связи с этим мы предположили, что коррекция патологического фенотипа, вызываемая МОД матери у потомства крыс линии WAG/Rij, может быть связана с повышением активности мезолимбической ДАергической системы мозга.

Цель работы — выяснить, влияет ли МОД матери на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Для достижения этой цели самкам крыс линии WAG/Rij предоставляли контрольную диету (КД) или МОД в течение одной недели до спаривания, в течение двух недель спаривания, во время беременности и в течение одной недели после рождения детенышей [7]. МОД на 1 кг пищи содержала доноры метильных групп (холин — 5 г, бетаин — 15 г, L-метионин — 7.5 г) и кофакторы одноуглеродного цикла (фолиевая кислота — 15 мг, витамин B12 — 1.5 мг, цинк — 150 мг). Эти добавки смешивали с 4-зерновой кашей, творогом и свежими яйцами [7, 10]. Самцы потребляли стандартную диету, за исключением периода спаривания. Во время спаривания самцы потребляли ту же самую диету, что и самки (КД или МОД). Показано, что МОД матери аналогичного состава вызывает коррекцию аудиогенных припадков у потомства крыс линии КМ [10] и агутти-окраса волосяного покрова у мышей [11]. Эти положительные фенотипические эффекты были связаны с усилением метилирования ДНК.

Данная работа проведена на крысах-самцах инбредной линии WAG/Rij, разводимых в институте ВНД и НФ РАН и представляющих примерно 73 поколение от родителей, исходно полученных из Нидерландов (Университет Radboud, Наймеген) в 1995 г. Использовано 7-месячное потомство, рожденное матерями, потреблявшими КД ( $n = 8$ ) и МОД ( $n = 8$ ). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным

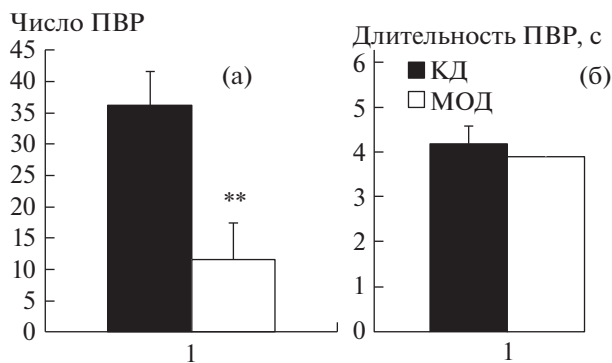
доступом к пище и воде по 4 особи в клетке в условиях естественного цикла день-ночь. Регистрацию ЭЭГ (с 16.00–19.00) с фронтальных (AP 2 мм, L 2.5 мм) и окципитальных (AP — 6 мм, L 4 мм) отделов коры мозга осуществляли у свободно передвигающихся животных с помощью беспроводного 8-канального усилителя биопотенциалов BR8V1 в соответствии с ранее описанным методом [6, 7]. Выраженность АЭ оценивали по числу и длительности ПВР. Выраженность коморбидной депрессии оценивали в тестах вынужденного плавания и предпочтения 2%-го раствора сахарозы (показатель агедонии) аналогично предыдущей работе [7]. После регистрации ЭЭГ и поведения у тех же самых животных исследовали нейробиохимию мозга. Содержание моноаминов и их метаболитов в терминальных областях ДАергических систем мозга, таких как префронтальная кора, прилежащее ядро, стриатум, гипоталамус и гиппокамп, определяли с помощью метода ВЭЖХ с электрохимической детекцией, детально описанного ранее [3].

Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим определением различий между средними значениями показателей по тесту Ньюмена–Кейлса и критерию U Манна–Уиттни. Связь между различными показателями оценивали по ранговому коэффициенту корреляции Спирмена. Эксперименты проведены в соответствии с международными правилами содержания и обращения с животными (Директива Европейского сообщества — Directive 2010/63/EU) и принципами, изложенными в положениях ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

ANOVA показал, что МОД матери оказывает значимое влияние на число ПВР [ $F(1.14) = 9.47$ ,  $p < 0.01$ ], но не влияет на их среднюю длительность (рис. 1).

МОД матери вызывала значимое уменьшение длительности иммобильности  $F(1.14) = 17.92$ ,  $p < 0.001$ , увеличение латентного периода иммобильности [ $F(1.14) = 9.22$ ,  $p < 0.01$ ] и длительности 1-го эпизода активного плавания (climbing) [ $F(1.14) = 5.78$ ,  $p < 0.05$ ], а также увеличение предпочтения сахарозы [ $F(1.14) = 10.20$ ,  $p < 0.01$ ] (рис. 2).

МОД матери не оказывала значимого влияния на длительность плавания [ $F(1.14) = 3.13$ ,  $p = 0.1$ ], ANOVA выявил значимый эффект МОД матери на содержание ДА [ $F(1.14) = 4.21$ ,  $p = 0.05$ ], а также на показатель метаболизма ДА — ГВК/ДА [ $F(1.14) = 11.08$ ,  $p < 0.01$ ] в прилежащем ядре: МОД повышала концентрацию ДА и уменьшала отношение ГВК/ДА. В стриатуме МОД матери вызывала повышение уровня НА [ $F(1.14) = 10.20$ ,  $p < 0.01$ ], уменьшение содержания ДА [ $F(1.14) = 5.20$ ,



**Рис. 1.** Влияние МОД матери на число (а) и среднюю длительность (б) ПВП у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Средние значения ± ошибка среднего ( $M \pm m$ ). \*\* –  $p < 0.01$ .

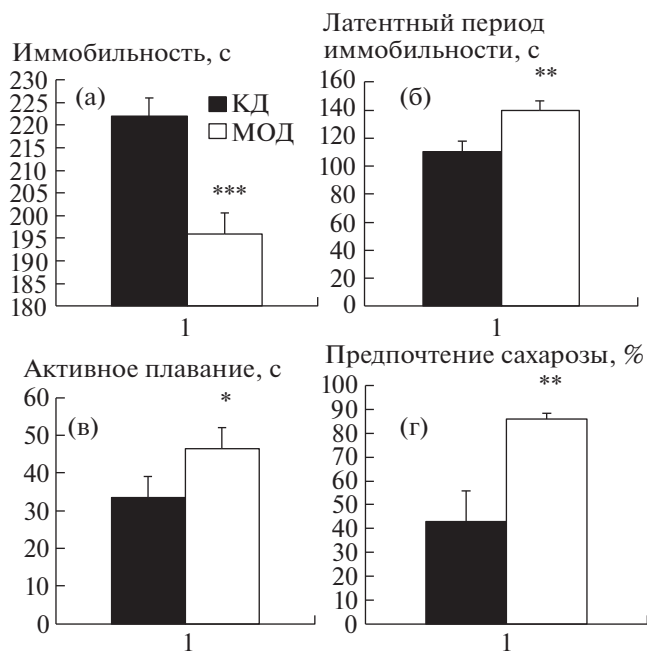
$p < 0.05$ ], метаболита ДА – ДОФУК [ $F(1.14) = 12.54, p < 0.01$ ] и показателя метаболизма ДА – ГВК/ДА [ $F(1.14) = 8.57, p < 0.05$ ].

В гиппокампе МОД матери вызывала значимое уменьшение содержания ДА [ $F(1.14) = 6.74, p < 0.05$ ] и увеличение показателя метаболизма ДА (отношение ГВК/ДА) [ $F(1.14) = 9.69, p < 0.01$ ]. Значимых влияний МОД матери на содержание моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре и гипоталамусе не обнаружено, за исключением тенденции к увеличению показателей метаболизма ДА (отношение ДОФУК/ДА) и 5-ОТ (5-ОИУК/5-ОТ) в гипоталамусе (табл. 1).

Обнаружена положительная корреляция между содержанием ДА в прилежащем ядре и предпочтением сахарозы [ $R(S) = 0.83, p < 0.05$ ], а также между содержанием ДА в стриатуме и длительностью 1-го эпизода активного плавания [ $R(S) = 0.77, p < 0.05$ ].

Установлена отрицательная корреляция между содержанием ДА в гиппокампе и длительностью 1-го эпизода активного плавания [ $R(S) = -0.75, p < 0.05$ ]. Кроме того, выявлена положительная корреляция между содержанием ДОФУК в прилежащем ядре и латентным периодом иммобильности в тесте вынужденного плавания [ $R(S) = 0.76, p < 0.05$ ].

Результаты свидетельствуют о том, что МОД матери подавляет проявление АЭ и коморбидной депрессии у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, что согласуется с ранее полученными данными [7]. Этот благоприятный фенотипический эффект МОД ассоциировался с повышением содержания ДА в прилежащем ядре, что свидетельствует о повышении тонуса мезолимбической ДА-ергической системы мозга. Мезолимбическая ДА-ергическая система мозга, связанная с мотивацией и подкреплением, играет важную роль в патогенезе депрессии [12] и ее фармакологической коррекции [13]. Недостаточность ДА в прилежа-



**Рис. 2.** Влияние МОД матери на длительность иммобильности (а), латентный период иммобильности (б), длительность 1-го эпизода активного плавания (climbing) (в) и предпочтение сахарозы (г) у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij. Средние значения ± ошибка среднего ( $M \pm m$ ). \*\*\* –  $p < 0.001$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \* –  $p < 0.05$ .

щем ядре вносит существенный вклад в патофизиологию ключевого симптома депрессивных расстройств, такого как агедония. Ранее нами было показано, что нейрохимическим механизмом поведенческих симптомов депрессии (повышенная иммобильность в тесте вынужденного плавания и пониженное потребление/предпочтение сахарозы) у крыс линии WAG/Rij является пониженное содержание ДА в прилежащем ядре [3]. Установлено, что повышение содержания ДА в прилежащем ядре приводит к уменьшению симптомов депрессивноподобного поведения (уменьшение длительности иммобильности в тесте вынужденного плавания и увеличение потребления сахарозы) [14, 15]. Эти данные позволяют предположить, что коррекция симптомов коморбидной депрессии, вызываемая МОД матери у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij, связана с повышением концентрации ДА в прилежащем ядре. Это предположение подтверждается наличием положительной корреляции между предпочтением сахарозы и концентрацией ДА в прилежащем ядре. Интересно, что системное или локальное (в прилежащее ядро) введение ДА-ергических агонистов подавляло симптомы АЭ (уменьшало число ПВП), а введение ДА-ергических антагонистов, напротив, увеличивало число ПВП [5, 16]. Эти данные указывают на то, что коррекция АЭ у

**Таблица 1.** Влияние МОД матери на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга у взрослого потомства крыс линии WAG/Rij

Показатели, нмоль/г ткани	Структуры мозга				
	Префронтальная кора	Прилежащее ядро	Стриатум	Гипоталамус	Гиппокамп
НА	3.08 ± 0.22 <b>2.79 ± 0.11</b>	3.75 ± 0.82 <b>3.50 ± 0.51</b>	1.21 ± 0.18 <b>1.78 ± 0.18*</b>	9.30 ± 0.33 <b>8.32 ± 0.81</b>	2.93 ± 0.17 <b>2.94 ± 0.18</b>
ДА	0.50 ± 0.05 <b>0.51 ± 0.03</b>	27.61 ± 2.14 <b>33.75 ± 2.09*</b>	51.77 ± 2.20 <b>45.10 ± 1.99*</b>	1.79 ± 0.07 <b>1.79 ± 0.32</b>	0.28 ± 0.05 <b>0.15 ± 0.01**</b>
ДОФУК	0.52 ± 0.24 <b>0.42 ± 0.67</b>	2.59 ± 0.29 <b>2.61 ± 0.19</b>	3.45 ± 0.17 <b>2.68 ± 0.14**</b>	0.06 ± 0.01 <b>0.09 ± 0.02</b>	0.23 ± 0.06 <b>0.15 ± 0.02</b>
ГВК	0.14 ± 0.04 <b>0.12 ± 0.04</b>	1.36 ± 0.09 <b>1.16 ± 0.14</b>	4.50 ± 1.02 <b>3.78 ± 0.96</b>	0.07 ± 0.01 <b>0.05 ± 0.01</b>	0.06 ± 0.01 <b>0.08 ± 0.01</b>
3-МТ	0.07 ± 0.01 <b>0.12 ± 0.03</b>	1.49 ± 0.37 <b>1.17 ± 0.22</b>	1.22 ± 0.18 <b>1.05 ± 0.1</b>	0.15 ± 0.04 <b>0.27 ± 0.08</b>	0.06 ± 0.01 <b>0.07 ± 0.01</b>
ДОФУК/ДА	0.95 ± 0.35 <b>0.82 ± 0.10</b>	0.09 ± 0.01 <b>0.08 ± 0.01</b>	0.07 ± 0.002 <b>0.06 ± 0.002*</b>	0.03 ± 0.01 <b>0.06 ± 0.01<sup>+</sup></b>	1.09 ± 0.43 <b>1.07 ± 0.18</b>
ГВК/ДА	0.30 ± 0.08 <b>0.23 ± 0.06</b>	0.05 ± 0.003 <b>0.03 ± 0.002**</b>	0.09 ± 0.02 <b>0.08 ± 0.02</b>	0.04 ± 0.01 <b>0.02 ± 0.01</b>	0.24 ± 0.02 <b>0.57 ± 0.10*</b>
5-ОТ	0.65 ± 0.24 <b>0.46 ± 0.17</b>	1.57 ± 0.21 <b>1.32 ± 0.09</b>	1.48 ± 0.12 <b>1.68 ± 0.10</b>	3.82 ± 0.22 <b>3.58 ± 0.20</b>	0.85 ± 0.42 <b>0.24 ± 0.05</b>
5-ОИУК	0.84 ± 0.28 <b>0.58 ± 0.21</b>	0.63 ± 0.15 <b>0.52 ± 0.06</b>	0.73 ± 0.12 <b>0.85 ± 0.12</b>	2.05 ± 0.19 <b>2.08 ± 0.11</b>	2.82 ± 1.45 <b>0.73 ± 0.17</b>
5-ОИУК/5-ОТ	1.47 ± 0.22 <b>1.31 ± 0.25</b>	0.38 ± 0.04 <b>0.39 ± 0.04</b>	0.46 ± 0.07 <b>0.51 ± 0.06</b>	0.53 ± 0.03 <b>0.58 ± 0.02<sup>+</sup></b>	3.41 ± 0.33 <b>3.27 ± 0.38</b>

Средние значения ± ошибка среднего ( $M \pm m$ ),  $n$  – число животных в группе. НА – норадреналин, ДА – дофамин, ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, 3-МТ – 3-метокситирамин, 5-ОТ – серотонин, 5-ОИУК – 5-оксиндолуксусная кислота. Значения показателей у потомства, рожденного матерями, потреблявшими КД,  $n = 8$  (верхняя строчка) и МОД,  $n = 8$  (нижняя строчка, выделено жирным шрифтом). \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , <sup>+</sup> –  $0.05 < p < 0.1$  (тенденция).

потомства, вызываемая МОД матери, может быть также связана с повышением содержания ДА в прилежащем ядре. Однако значимых корреляций между числом ПВР и содержанием ДА в прилежащем ядре не выявлено. Значимых корреляций между длительностью иммобильности в тесте вынужденного плавания и содержанием моноаминов и их метаболитов не обнаружено ни в одной из исследованных структур мозга. Вместе с тем выявлена положительная корреляция между длительностью 1-го эпизода активного плавания (climbing) и содержанием ДА в стриатуме. Эта корреляция, видимо, отражает связь между интенсивностью двигательных реакций во время этого вида поведения (сильные движения передними лапами, подпрыгивания) и концентрацией ДА в стриатуме. Известно, что возникновение повторяющихся спонтанных эпилептических судорог после эпилептического статуса, вызываемого пилокарпином, сопровождается повышением концентрации ДА в гиппокампе и уменьшением скорости его утилизации [17]. Можно предполо-

жить, что уменьшение числа ПВР, вызываемое МОД матери у потомства крыс линии WAG/Rij, обусловлено снижением концентрации ДА и увеличением скорости его утилизации в гиппокампе, а также повышением концентрации НА, который обладает антиэпилептической активностью, в стриатуме. Уменьшение содержания ДА и увеличение содержания НА в стриатуме свидетельствуют о повышении активности ДА-β-гидроксилазы. Интересно, что МОД вызывала повышение уровня ДА в прилежащем ядре, но уменьшала его содержание в стриатуме и гиппокампе. Такое разнонаправленное действие МОД, видимо, связано со спецификой морфо-функциональной организации мезолимбической и нигростриатной ДАергетической систем, а также с особенностями эпигенетической регуляции обмена моноаминов в этих структурах мозга. Системные факторы, такие как стресс или фармакологические препараты, обычно вызывают однонаправленные нейрохимические эффекты, которые могут быть в разной степени выражены в различных структурах мозга.

Возможно, что разнонаправленность эффектов обусловлена опосредованным влиянием диеты матери на мезолимбическую ДАергическую систему через другие нейромедиаторные системы мозга, например ГАМКергическую, глутаматергическую. Это предположение требует дальнейшей проверки. Отсутствие эффекта МОД на ДАергическую систему во фронтальной коре (мезокортикальная система) может свидетельствовать в пользу этого предположения. В случае прямого влияния МОД наблюдалось бы однонаправленное ее влияние на весь процесс синтеза, метаболизма и рецепторной регуляции ДА в разных структурах мозга в равной степени, что характерно для действия нейролептиков, психостимуляторов и некоторых антидепрессантов. Известно, что глутаматергическая система гиппокампа может усиливать активность ДАергических нейронов в вентральной тегментальной области и повышать содержание ДА в прилежащем ядре [18]. В связи с этим избирательное повышение уровня ДА в терминальной области мезолимбической системы мозга (прилежащее ядро) могло бы быть, в частности, объяснено влиянием глутаматергической системы гиппокампа.

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что МОД матери во время перинатального периода вызывает стойкое повышение тонуса мезолимбической ДАергической системы мозга у потомства крыс линии WAG/Rij, которое сохраняется спустя длительное время после прекращения действия МОД. Можно предположить, что возможным механизмом положительного эффекта МОД матери на тонус мезолимбической ДАергической системы мозга у потомства является прямое активирующее воздействие донора метильных групп SAME на синтез ДА, а также опосредованный эффект через активацию метилирования ДНК и экспрессии гена тирозингидроксилазы — фермента, катализирующего синтез ДА, что было показано нами ранее [9]. Известно, что нарушения реакций трансметилирования и дефицит SAME из-за недостаточности доноров метильных групп приводят к неврологическим и психическим заболеваниям, включая эпилепсию и депрессию. На киндлинговой модели височной эпилепсии у крыс показан антиэпилептический эффект SAME [19]. На модели депрессии, вызываемой хроническим умеренным стрессом у мышей, продемонстрирован также антидепрессантный эффект SAME (уменьшение длительности иммобильности в тесте вынужденного плавания и увеличение предпочтения сахара) [20].

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что диета матери, обогащенная донорами метильных групп и кофакторами одноуглеродного цикла, может быть использована в качестве новой терапевтической стратегии, чтобы

предотвратить развитие гипофункции мезолимбической ДАергической системы мозга и ассоциированной с ней наследственной АЕ и коморбидной депрессии у потомства.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00327а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sarkisova K., van Luijtelaaar G. // Progress Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry. 2011. V. 35. P. 854–876.
2. Blumenfeld H. // Progress Brain Res. 2005. V. 150. P. 271–286.
3. Саркисова К.Ю., Куликов М.А., Кудрин В.С., и др. // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2014. Т. 63. № 3. С. 303–315.
4. Sarkisova K.Yu., Kulikov M.A., Midzyanovskaya I.S., et al. // Neurosci. Behav. Physiol. 2008. V. 38. № 2. P. 119–128.
5. Cavarec F., Krauss P., Witkowski T., et al., // Epilepsia. 2019. V. 60. P. 2128–2140.
6. Sarkisova K.Y., Gabova A.V. // Genes Brain Behav. 2018. V. 17. № 7: e12477.
7. Саркисова К.Ю., Габова А.В., Федосова Е.А., и др. // Доклады Академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494. С. 508–512.
8. Mischoulon D., Fava M. // Am. J. Clin. Nutr. 2002. V. 76 (suppl). P. 1158S–1161S.
9. Sarkisova K., Fedosova E., Shatskova A., et al. // Epilepsia. 2021. V. 62. Issue S3. P. 135–136.
10. Poletaeva I.I., Surina N.M., Ashapkin V.V., et al. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2014. V. 127. P. 21–26.
11. Cooney C.A., Dave A.A., Wolff G.L. // J. Nutr. 2002. V. 132. № 8 (Suppl.). P. 2393S–2400S.
12. Nestler E.J., W.A., Jr. // Biol. Psychiatry. 2006. V. 59. P. 1151–1159.
13. Shirayama Y., Chaki S. // Curr. Neuropharmacol. 2006. V. 4. P. 277–291.
14. Kitamura Y., Yagi T., Kitagawa K., et al. // Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol. 2010. V. 382. P. 151–158.
15. Hajnal A., Norgren R. // Brain Res. 2001. V. 904. P. 76–84.
16. Deransart C., Riban V., Marescaux C., et al. // Neurosci. 2000. V. 100. P. 335–344.
17. Cavalheiro E.A., Fernandes M.J., Turski L., et al. // Epilepsia. 1994. 35. P. 1–11.
18. Floresco S.B., Todd C.L., Grace A.A. // J. Neurosci. 2001. V. 21. P. 4915–4922.
19. Dhediya R.M., Joshi S.S., Gajbhiye S.V., et al. // Epilepsy Behav. 2016. V. 61. P. 153–157.
20. Luo X., Fang T.-Y., Zhang Y., et al. // Neuropsychiatry (London). 2018. V. 8. P. 495–504.

## MATERNAL METHYL-ENRICHED DIET INCREASES DOPAMINERGIC TONE OF THE MESOLIMBIC BRAIN SYSTEM IN ADULT OFFSPRING OF WAG/Rij RATS

K. Yu. Sarkisova<sup>a, #</sup>, E. A. Fedosova<sup>a</sup>, A. B. Shatskova<sup>a</sup>, V. B. Narkevich<sup>b</sup>, and V. S. Kudrin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Federal State Budgetary Scientific Research Institution "Scientific Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov", Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: karine.online@yandex.ru*

Presented by Academician of the RAS M.V. Ugryumov

The aim of this study is to find out whether maternal methyl-enriched diet affects the content of monoamines and their metabolites in brain structures of adult WAG/Rij offspring. It has been shown for the first time that maternal methyl-enriched diet (choline, betaine, folic acid, vitamin B12, L-methionine, zink) during the perinatal period increases dopaminergic tone of the mesolimbic brain system in adult offspring of WAG/Rij rats, which is accompanied by the suppression of the symptoms of genetic absence epilepsy and comorbid depression. Results suggest that maternal methyl-enriched diet during the perinatal period may be served as a new therapeutic strategy to prevent the development of a hypofunction of the mesolimbic dopaminergic brain system and associated genetic absence epilepsy and comorbid depression in offspring.

*Keywords:* absence epilepsy, comorbid depression, genetic model, maternal methyl-enriched diet, offspring, brain monoamines



УДК 595.14+ УДК 594.14

## ПЕРВЫЙ ОПЫТ СОДЕРЖАНИЯ ПОГОНОФОР (ANNELIDA: SIBOGLINIDAE) В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2022 г. А. А. Прудковский<sup>1</sup>, Н. П. Карасева<sup>1,\*</sup>, М. Н. Римская-Корсакова<sup>2</sup>, Т. П. Пименов<sup>1</sup>,  
Н. Н. Римская-Корсакова<sup>1</sup>, академик РАН В. В. Малахов<sup>1</sup>

Поступило 20.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принято к публикации 20.05.2022 г.

Описаны параметры содержания бескишечных симбиотрофных аннелид *Siboglinum fiordicum* в лабораторных условиях вне морского стационара в течение 64 дней.

**Ключевые слова:** френулятные погонофоры, Siboglinidae, *Siboglinum fiordicum*, культивирование морских беспозвоночных

**DOI:** 10.31857/S2686738922050225

Siboglinidae Caullery 1914 – семейство морских аннелид, все представители которого лишены пищеварительного тракта. Их жизнедеятельность обеспечивается благодаря симбиотическим бактериям, обитающим в специальном органе – трофосоме. Так называемые френулятные погонофоры (подсемейство Siboglininae Caullery, 1914) – наиболее многочисленная группа семейства, широко распространенная группа во всех океанах нашей планеты. Это тонкие нитевидные черви, обитающие в хитиновых трубках, погруженных в мягкие осадки. Представители френулятных погонофор имеют симбионтов, которые способны окислять сероводород или метан [1–5]. Френулятные погонофоры вызывают большой интерес как возможные организмы – индикаторы подводных залежей углеводородов [6–8]. В связи с этим представляет особый интерес исследование экологической физиологии френулятных погонофор, в частности определение тех концентраций растворенных в капиллярной воде газов (в первую очередь, сероводорода и кислорода), которые необходимы для поддержания их жизнедеятельности. Вплоть до настоящего времени в литературе отсутствовали сведения о возможности длительного культивирования френулятных погонофор вне морских стационаров. В настоящей работе сделана попытка культивирования френулятных погонофор в лабораторных условиях в

специально спроектированном морском аквариуме и определения параметров их содержания.

Особи *Siboglinum fiordicum* Webb, 1963 и пробы осадка были собраны в Северном море в районе пролива Юпсесунд (Ørpesundet, 60°33'38" N, 5°0'20" E) при помощи дночерпателя Ван-Вина (0.25 м<sup>2</sup>) с глубины 33–35 м 7–15 февраля 2022 г. Для транспортировки живые погонофоры были помещены в 50 мл пробирки и перевезены в 2 л термосах (Thermos, США) с хладагентами. Черви были доставлены в Москву 18.02.2022, и 22.02.2022 помещены в специально спроектированный аквариум на кафедре зоологии беспозвоночных Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

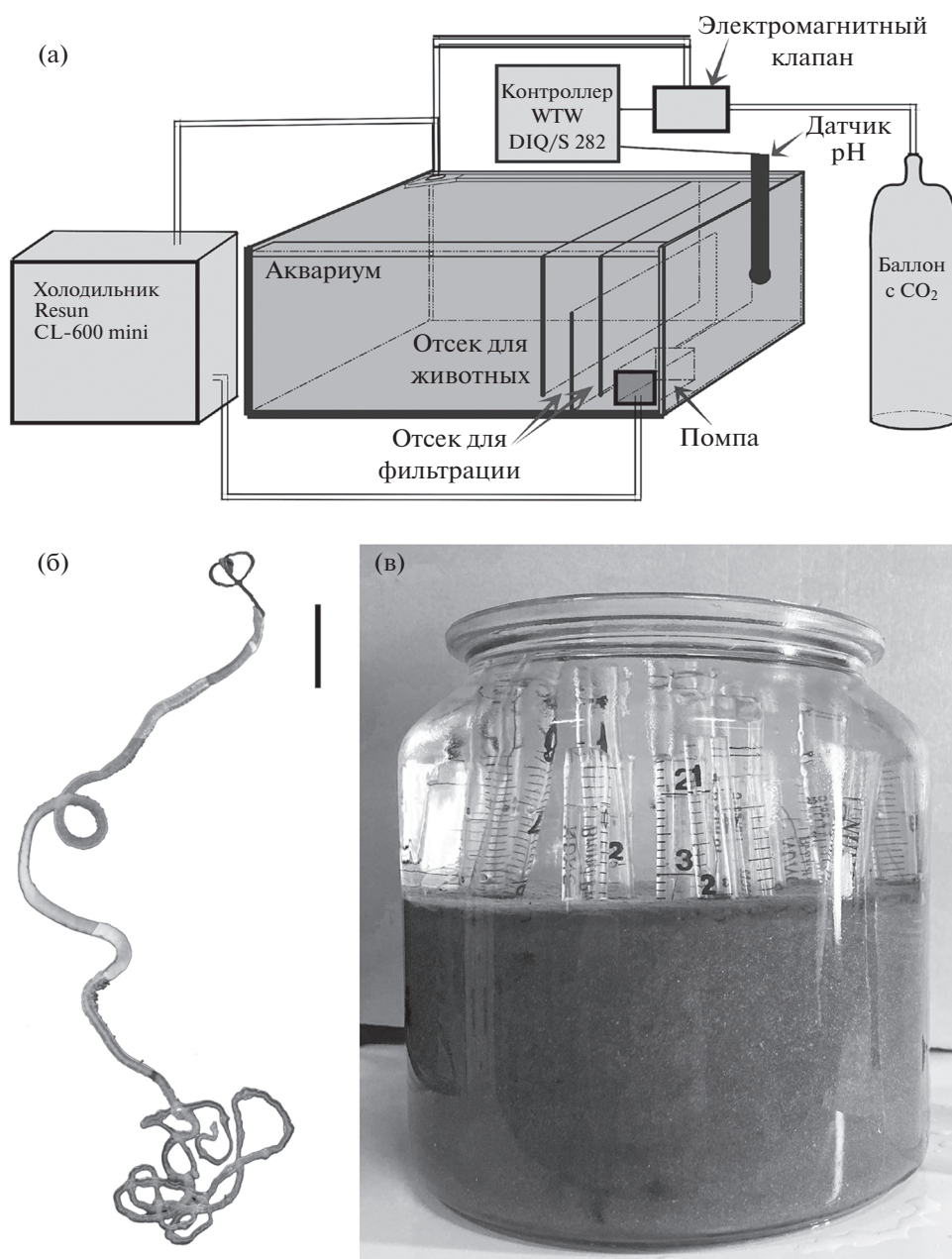
Воду для определения содержания растворенного кислорода и pH в придонном слое в проливе Юпсесунд отбирали при помощи батометра Руттнера (KC Denmark A/S), концентрации кислорода определяли методом Винклера [9], измерения температуры и солености проводили STD-зондом SAIVA/S SD204 (SAIVA/S, Норвегия). Сероводород из поровой воды осадка (полученной с горизонтов 4 и 7 см от поверхности дна) определяли методом фотометрии с метиленовым голубым [10]. Два месяца спустя после посадки червей в аквариум аналогичным образом проведены измерения концентрации растворенного сероводорода в поровых водах осадка внутри аквариума с горизонтов 2–7 см.

Установка создана на основе аквариума размером 80 × 50 × 35 см, общим объемом 140 л. В целях водоподготовки использована система обратного осмоса Гейзер-престиж 2 (Россия) в сочетании с мембраной ULP1812/2012 (Vontron, Китай) и

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

<sup>2</sup> Институт океанологии им. П.П. Шишова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: oasisia@gmail.com



**Рис. 1.** а – схема экспериментальной установки, б – Внешний вид *Siboglinum fiordicum* (масштаб: 1 мм), в – одна из емкостей с грунтом, использованная для посадки червей в аквариум.

ионообменной смолой Spectrum SRDI (Великобритания). Для получения морской воды с соленостью 33 ‰ использовалась соль Coral Pro (Red Sea, Израиль). Два отсека аквариума содержали мелкопористую губку для механической фильтрации и осаждения взмученного осадка. Для поддержания постоянной температуры около 6–8°C использован аквариумный холодильник Mini 600 (Resun, Китай). Для постоянного мониторинга условий и регуляции концентрации кислорода и pH использован двухканальный промышленный контроллер WTW DIQ/S 282 (Xylem

inc., США) в сочетании с pH электродом SensoLyt® SEA (Xylem inc., США) и оптическим датчиком содержания растворенного кислорода FDO®700 IQ SW (Xylem inc., США). Контроллер для управления электромагнитным клапаном G7J (Camozzi, Италия) включает подачу углекислого газа при повышении pH выше 7.6. Общая схема установки приведена на рис. 1. Аквариум был запущен за три месяца до посадки погонофор для стабилизации состава воды.

Всего в аквариум были помещены 44 особи *S. fiordicum*. Черви были помещены в пластико-

**Таблица 1.** Параметры емкостей, погруженных в аквариум и распределение особей *S. fiordicum* при посадке в аквариум

	Емкость 1	Емкость 2	Емкость 3	Емкость 4
Общий объем (л)	0.5	0.5	1.64	2
Объем грунта (л)	0.3	0.3	0.6	1.4
Глубина слоя осадка, см	7.5	7.5	7	8.5
Количество червей на момент посадки	8	8	13	13
Количество выживших к 26.04.2022	1	0	0	2

**Таблица 2.** Сравнение основных абиотических параметров среды в проливе Юпсесунд и экспериментальной установке. “—” означает, что этот параметр не был измерен

Параметры	Пролив Юпсесунд	Экспериментальная установка
Температура придонного слоя воды, °C	9.2	6–8
Соленость придонного слоя воды, ‰	33.2	33.0
pH придонного слоя воды	7.96	~7.6
pH поровой воды в осадке на глубине 4–7 см	7.5–7.7	—
[O <sub>2</sub> ] в придонном слое воды, мг/л	7.71	7.65–8.5
[H <sub>2</sub> S] в поровой воде в осадке на глубине 4–7 см, мкМ	2.1–11.9	0.83–3.24

вые трубки с внутренним диаметром 7 и 8 мм, длиной 10–15 см. Нижний конец трубок был затянут мельничным ситом с ячейей 100 мкм, а в боковых стенах через каждые 1.5–2 см были просверлены отверстия диаметром 2 мм. Эти отверстия обеспечивали проникновение воды и частиц грунта внутрь трубки. Пластиковые трубки с червями помещались в стеклянные емкости объемом 0.5–2 л, частично заполненные осадком (табл. 1, рис. 1).

Осадок для размещения червей в аквариуме был отобран параллельно со сбором червей в проливе Юпсесунд и транспортировался в пластиковых контейнерах по 0.5 и 2 л. Черви *S. fiordicum* содержались в аквариуме на протяжении 64 дней с 22.02.2022 (момент посадки) по 26.04.2022 (момент проверки). Для оценки состояния червей на 26.04.2022 мы вынимали червей из пластиковой трубки и проводили их осмотр под стереомикроскопом. В качестве индикаторов состояния червя мы оценивали его подвижность внутри хитиновой трубки, целостность его переднего и заднего конца, наличие переднего щупальца и сохранение естественной красноватой окраски тела. В табл. 2 приведены параметры содержания *S. fiordicum* в лабораторных условиях, которые были максимально приближены к условиям среды обитания в месте сбора червей.

По результатам содержания в аквариуме в течение 64 дней в хорошем состоянии осталось 3 особи. Полученные результаты показывают возможность содержания френулятных погонофор в лабораторных условиях более 2-х месяцев при

поддержании параметров среды, близких к таковым в естественном местообитании. Низкая выживаемость червей в лабораторных условиях, возможно, связана с травмирующим способом сбора червей. *S. fiordicum* обитают в относительно длинных (до 243 мм) и очень тонких (0.2–0.3 мм в диаметре) трубках. При сборе с помощью дночерпателя, промывке и извлечении *S. fiordicum* из проб грунта их трубки перегибаются, что приводит к повреждению мягких тканей, которое остается незамеченным при визуальном обследовании. Для успешного культивирования *S. fiordicum* необходимо разработать щадящие методы сбора червей и их транспортировки.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 20-74-10011, а также в рамках Госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова 121032300121-0. Химические исследования проводились в рамках Госзадания ИО РАН им. П.П. Ширшова № 0128-2021-0004.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандар-

там учреждения или принятой практике для таких исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmaljohann R., Flügel H.J. Methane-oxidizing bacteria in Pogonophora // Sarsia. 1987. V. 72 (1). P. 91–98.
2. Schmaljohann R., Faber E., Whiticar M. et al. Co-existence of methane- and sulphur-based endosymbioses between bacteria and invertebrates at a site in the Skagerrak // Marine Ecology Progress Series. 1990. V. 61. P. 119–124.
3. Naganuma T., Elsaied H.E., Hoshii D., et al. Bacterial endosymbioses of gutless tube-dwelling worms in non-hydrothermal vent habitats // Marine biotechnology. 2005. V. 7 (5). P. 416–428.
4. Aida M., Kanemori M., Kubota N., et al. Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont harbored in Oligobranchia mashikoi (a Siboglinid Polychaete) inhabiting Tsukumo Bay // Microbes and environments. 2008. V. 23 (1). P. 81–88.
5. Lösekann T., Robador A., Niemann H., et al. Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an Arctic Cold Seep (Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea) // Environmental Microbiology. 2008. V. 10. P. 3237–3254.
6. Savvichev A.S., Kadnikov V.V., Kravchishina M.D., et al. Methane as an organic matter source and the trophic basis of a Laptev Sea cold seep microbial community // Geomicrobiology Journal. 2018. V. 35 (5). P. 411–423.
7. Rimskaya-Korsakova N.N., Karaseva N.P., Kokarev V.N., et al. First Discovery of Pogonophora (Annelida, Siboglinidae) in the Kara Sea Coincide with the Area of High Methane Concentration // Doklady Biological Sciences. 2020. V. 490 (1). P. 25–27.
8. Karaseva N., Gantsevich M., Obzhirov A., Shakirov R., Starovoitov A., Smirnov R., et al. Correlation of the siboglinid (Annelida: Siboglinidae) distribution to higher concentrations of hydrocarbons in the Sea of Okhotsk // Marine Pollution Bulletin. 2020. V. 158. P. 111448.
9. Современные методы гидрохимических исследований океана. М.: ИОАН СССР; 1992. 200 p.
10. Cline J.D. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters // Limnology and Oceanography. 1969. V. 14. P. 454–458.

## THE FIRST EXPERIENCE OF KEEPING POGONOPHORANS (ANNELIDA: SIBOGLINIDAE) IN THE LABORATORY

A. A. Prudkovsky<sup>a</sup>, N. P. Karaseva<sup>a, #</sup>, M. N. Rimskaya-Korsakova<sup>b</sup>, T. P. Pimenov<sup>a</sup>, N. N. Rimskaya-Korsakova<sup>a</sup>, and Academician of the RAS V. V. Malakhov<sup>a</sup>

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

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

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

The parameters of maintenance of the gutless symbiotrophic annelids *Siboglinum fiordicum* in laboratory conditions outside the marine biological station for 64 days are described.

**Keywords:** Frenulatae, Siboglinidae, *Siboglinum fiordicum*, cultivation of marine invertebrates