

СОДЕРЖАНИЕ

Том 496, 2021

Плейстоценовые млекопитающие из пещеры Лангчанг (Вьетнам): новые данные <i>А. В. Лопатин, Е. Н. Мащенко, И. А. Вислобокова, Н. В. Сердюк, Ле Суан Дак</i>	5
Гигантская гиена <i>Pachycrocuta brevirostris</i> (Hyaenidae, Carnivora) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым <i>А. В. Лавров, Д. О. Гимранов, Д. Б. Старцев, А. В. Лопатин</i>	10
О геометрических закономерностях формирования рельефа экзоскелета ранних позвоночных (Osteostraci, Agnatha) на плоскости <i>О. Б. Афанасьева</i>	15
Ревизия теории Флора — “ген-на-ген” — для феноменов взаимодействия проростков зерновых культур с возбудителями ржавчин <i>М. А. Колесова, А. А. Зуева, Л. Г. Тырышкин</i>	19
Строение выделительной системы плероцеркоида <i>Pyramicocephalus phocarum</i> (Cestoda: Diphyllbothriidea): доказательство существования самостоятельных терминальных клеток <i>Н. М. Бисерова, А. Р. Мустафина, В. В. Малахов</i>	24
Концентрические включения в кишечном эпителии эхиуриды <i>Bonellia viridis</i> : строение и возможная функция <i>П. А. Кузнецов, Е. Н. Темерева</i>	28
Двигательная активность и “неотенический” сон у голого землекопа (<i>Heterocephalus glaber</i>) в условиях изоляции <i>В. М. Ковальзон, О. А. Аверина, М. Ю. Высоких</i>	32
Особенности иннервации шупалец <i>Flustrellidra hispida</i> и эволюция лофофора у Bryozoa <i>М. А. Исаева, И. А. Косевич, Е. Н. Темерева</i>	37
Следы древнейших трофических взаимодействий в рифейской биоте (лахандинский лагерштетт, юго-восточная Сибирь) <i>Ю. В. Шувалова, К. Е. Наговицин, П. Ю. Пархаев</i>	41
Хеликаза MLE — новый участник регуляции транскрипции гена <i>ftz-f1</i> , кодирующего ядерный рецептор у высших эукариот <i>Ю. В. Николенко, М. М. Куриакова, А. Н. Краснов, С. Г. Георгиева</i>	48
Иммортализация кератиноцитов человека с помощью каталитической субъединицы теломеразы <i>А. К. Бейлин, Н. Г. Гурская, Н. А. Евтушенко, Е. В. Алеева, А. В. Косых, В. В. Терских, А. В. Васильев, Е. А. Воротеляк</i>	52
Бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония как ингибитор общей активности щелочной фосфолипазы A ₂ мононуклеаров <i>П. А. Стороженко, М. М. Расулов, И. В. Жигачёва, В. П. Барышок</i>	57

Рациональный дизайн и мутагенез люциферазы гриба <i>Neonothopanus nambi</i> <i>К. А. Береговая, Н. М. Мышкина, Т. В. Чепурных, А. А. Котлобай, К. В. Пуртов, В. Н. Петушков, Н. С. Родионова, И. В. Ямпольский</i>	61
Исследование взаимодействия Xmas-2, основного белка TREX-2 комплекса экспорта мРНК, и белка Ogc3, субъединицы ORC комплекса <i>D. melanogaster</i> <i>М. М. Куршакова, Д. В. Копытова, С. Г. Георгиева</i>	66
Межхромосомные контакты генов рРНК в трех линиях клеток человека связаны с сайленсингом генов, контролирующих морфогенез <i>Н. А. Чуриков, Е. С. Клушевская, Ю. В. Кравацкий, Г. И. Кравацкая, Д. М. Федосеева</i>	70
Новые негативно-полярные гены в РНК-геноме коронавируса <i>О. П. Жирнов, С. В. Поярков</i>	75
Ингибитор GSK3 киназы CHIR подавляет транскрипцию тканеспецифических изоформ POU2F1 в клетках лимфомы Беркитта Namalwa <i>Е. В. Панкратова, Т. Н. Порцева, А. А. Макарова, Ю. В. Ильин, А. Г. Степченко, С. Г. Георгиева</i>	80
Эффективность последовательного применения пластиковых и титановых имплантатов при экспериментальном замещении дефекта нижней челюсти у животных с помощью предварительного цифрового проектирования <i>Ал. Ал. Долгалева, Д. С. Святославов, В. А. Путь, И. В. Решетов, И. В. Кастыро</i>	85
Различия жирнокислотного состава пауков-кругопрядов, обитающих в прибрежье озера и в степи, обусловлены потреблением разных таксонов имаго хирономид <i>Н. Н. Сущик, Е. В. Борисова, И. А. Дёмина (Витковская), О. Н. Махутова, М. И. Гладышев</i>	89
Термовакцинация – термогелиокс как стимулятор иммунного ответа. Кинетика синтеза антител и С-реактивного белка при коронавирусной инфекции <i>С. Д. Варфоломеев, С. В. Журавель, А. А. Панин, Л. В. Шогенова, В. И. Быков, С. Б. Цыбенкова, А. М. Рябоконт, И. И. Уткина, П. В. Гаврилов, А. Г. Чучалин</i>	94
Получение клонированного потомства и редактирование генома эмбриональных фибробластов с использованием системы CRISPR/CAS9 у крупного рогатого скота <i>Г. Н. Сингина, П. В. Сергеев, А. В. Лопухов, М. П. Рубцова, Н. П. Тарадайник, Н. В. Равин, Е. Н. Шедова, Т. Е. Тарадайник, И. А. Полежаева, А. В. Доцев, Г. Брем, О. А. Донцова, Н. А. Зиновьева</i>	99
Рекомбинантная люцифераза гриба <i>Neonothopanus nambi</i> : получение и свойства <i>А. Ю. Горюховатский, Т. В. Чепурных, А. С. Щеглов, Ю. А. Мокрушина, М. Н. Баранова, С. А. Гончарук, К. В. Пуртов, В. Н. Петушков, Н. С. Родионова, И. В. Ямпольский</i>	104

CONTENTS

Vol. 496, 2021

Pleistocene Mammals from the Lang Trang cave (Vietnam): new data <i>A. V. Lopatin, E. N. Maschenko, I. A. Vislobokova, N. V. Serdyuk, Le Xuan Dac</i>	5
Giant Hyena <i>Pachycrocuta brevirostris</i> (Hyaenidae, Carnivora) from the Lower Pleistocene of Taurida cave, Crimea <i>A. V. Lavrov, D. O. Gimranov, D. B. Startsev, A. V. Lopatin</i>	10
On the Geometric Regularities of the Formation of the Exoskeletal Relief of Early Vertebrates (Osteostraci, Agnatha) on a Plane <i>O. B. Afanassieva</i>	15
Revision of the Gene-for-Gene Flor's theory for the Phenomenons of Interaction of Sereals Seedlings with Rust Pathogens <i>M. A. Kolesova, A. A. Zueva, L. G. Tyryshkin</i>	19
Structure of the Excretory System of Plerocercoids <i>Pyramicocephalus phocarum</i> (Cestoda: Diphyllbothriidea): Proof for the Existence of an Independent Terminal Cells <i>N.M. Biserova, A.R. Mustafina, V.V. Malakhov</i>	24
Concentric Inclusions in the Intestine Epithelium of Echiura <i>Bonellia viridis</i> : Structure and Possible Function <i>P. A. Kuznetsov, E. N. Temereva</i>	28
Motor Activity and "Neotenic" Sleep in the Naked Mole Rat (<i>Heterocephalus glaber</i>) under Isolation <i>V. M. Kovalzon, O. A. Averina, M. Yu. Vysokikh</i>	32
Peculiarities of Tentacles Innervation of <i>Flustrellidra hispida</i> and Evolution of Lophophore in Bryozoa <i>M. A. Isaeva, I. A. Kosevich, E. N. Temereva</i>	37
Evidences of the Oldest Trophic Interactions in the Riphean Biota (Lakhanda Lagerstätte, Southeastern Siberia) <i>J. V. Shuvalova, K. E. Nagovitsyn, P. Yu. Parkhaev</i>	41
MLE Helicase is a New Participant in the Transcription Regulation of the <i>ftz-fl</i> Gene Encoding Anuclear Receptor in Higher Eukaryotes <i>J. V. Nikolenko, M. M. Kurshakova, A. N. Krasnov, S. G. Georgieva</i>	48
Immortalization of Human Keratinocytes Using the Catalytic Subunit of Telomerase <i>A. K. Beilin, N. G. Gurskaya, N. A. Evtushenko, E. V. Alpeeva, A. V. Kosykh, V. V. Terskikh, A. V. Vasiliev, E. A. Vorotelyak</i>	52
Bis (μ -tartrato) di (μ -hydroxo) Germanate (IV) Triethanolammonium as an Alkaline Phospholipase A2 Inhibitor Mononuclears <i>P. A. Storozhenko, M. M. Rasulov, I. V. Zhigacheva, V. P. Baryshok</i>	57
Rational Design and Mutagenesis of Fungal Luciferase from <i>Neonothopanus nambi</i> <i>K. A. Beregovaja, N. M. Myshkina, T. V. Chepurnykh, A. A. Kotlobay, K. V. Purtov, V. N. Petushkov, N. S. Rodionova, I. V. Yampolsky</i>	61

Study of the Interaction Between Xmas-2, the Main Protein of TREX-2 mRNA Export Complex, and the Orc3 Protein, a Subunit of ORC Complex of <i>D. melanogaster</i>	66
<i>M. M. Kurshakova, D. V. Kopytova, S. G. Georgieva</i>	
Inter-chromosomal Contacts of rDNA Clusters in Three Human Cell Lines are Associated with Silencing of Genes Controlling Morphogenesis	70
<i>N. A. Tchurikov, E. S. Klushevskaya, Y. V. Kravatsky, G. I. Kravatskaya, D. M. Fedoseeva</i>	
Novel Negative Sense Genes in the RNA Genome of Coronaviruses	75
<i>O. P. Zhirnov, S. V. Poyarkov</i>	
GSK3 Kinase Inhibitor, CHIR, Suppress Transcription of Tissue Specific POU2F1 Isoform in Burkitt Namalwa Lymphoma Cells	80
<i>E. V. Pankratova, T. N. Portseva, A. A. Makarova, Yu. V. Ilyin, A. G. Stepchenko, S. G. Georgieva</i>	
The Effectiveness of the Sequential Use of Plastic and Titanium Implants for Experimental Replacement of the Mandibular Defect in Animals Using Preliminary Digital Design	85
<i>Al. Al. Dolgalev, D. S. Svyatoslavov, V. A. Pout, I. V. Reshetov, I. V. Kastyro</i>	
Differences in Fatty Acid Composition Between ORB-weaver Spiders Inhabited a Riparian Zone and a Steppe are Associated with the Consumption of Different Chironomid Taxa	89
<i>N. N. Sushchik, E. V. Borisova, I. A. Demina (Vitkovskaya), O. N. Makhutova, M. I. Gladyshev</i>	
Thermovaccination – Thermoheliox as an Immune Response Stimulator. Kinetics of Antibodies and C-reactive Protein Synthesis in Coronaviral Infection	94
<i>S. D. Varfolomeev, S. V. Zhuravel, A. A. Panin, L. V. Shogenova, V. I. Bykov, S. B. Tsybenova, A. M. Ryabokon, I. I. Utkina, P. V. Gavrilov, A. G. Chuchalin</i>	
Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle	99
<i>G. N. Singina, P. V. Sergiev, A. V. Lopukhov, M. P. Rubtsova, N. P. Taradajnic, N. V. Ravin, E. N. Shedova, T. E. Taradajnic, I. A. Polejaeva, A. V. Dozev, G. Brem, O. A. Dontsova, N. A. Zinovieva</i>	
The Recombinant Luciferase of the Fungus <i>Neonothopanus nambi</i> : Obtaining and Properties	104
<i>A. Yu. Gorokhovatsky, T. V. Chepurnykh, A. S. Shcheglov, Yu. A. Mokrushina, M. N. Baranova, S. A. Goncharuk, K. V. Purto, V. N. Petushkov, N. S. Rodionova, I. V. Yampolsky</i>	

УДК 569:551.793(597)

ПЛЕЙСТОЦЕНОВЫЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ ИЗ ПЕЩЕРЫ ЛАНГЧАНГ (ВЬЕТНАМ): НОВЫЕ ДАННЫЕ

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин^{1,*}, Е. Н. Машенко^{1,2},
И. А. Вислобокова¹, Н. В. Сердюк^{1,2}, Ле Суан Дак³

Поступило 27.07.2020 г.

После доработки 01.08.2020 г.

Принято к публикации 03.08.2020 г.

По материалам, собранным в 2020 г. из плейстоцена пещеры Лангчанг в северном Вьетнаме, определены приматы *Pongo* sp., *Trachypithecus* sp., *Macaca* cf. *nemestrina* (Linnaeus, 1766) и *Macaca* sp., хищные *Arctonyx collaris rostratus* Matthew et Granger, 1923 и *Panthera* sp., рукокрылые *Ia io* Thomas, 1902, грызуны *Hystrix kiangsenensis* Wang, 1931, хоботные *Elephas* sp., непарнокопытные *Tapirus indicus* (Desmarest, 1819) и *Dicerorhinus sumatrensis* (Fischer, 1814), парнокопытные *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, *S. barbatus* Müller, 1838, *Tragulus kanchil* (Raffles, 1821), *Hydropotes inermis* Swinhoe, 1870, *Muntiacus muntjak* (Zimmermann, 1780), *Axis porcinus* (Zimmermann, 1780), *Rusa unicolor* (Kerr, 1792) и *Capricornis sumatraensis* (Bechstein, 1799). *I. io*, *S. barbatus*, *T. kanchil*, *H. inermis* и *A. porcinus* идентифицированы в составе фауны Лангчанг впервые. В комплексе млекопитающих преобладают обитатели тропических лесов (от равнинных до горных), а также представлены субтропические формы.

Ключевые слова: Mammalia, Primates, Carnivora, Chiroptera, Rodentia, Proboscidea, Perissodactyla, Artiodactyla, плейстоцен, пещера Лангчанг, Вьетнам

DOI: 10.31857/S2686738921010170

Карстовая пещера Лангчанг (Lang Trang) расположена в северном Вьетнаме, в уезде Батхьюк провинции Тханьхоа (20°21'42" с.ш., 105°31'42" в.д.). Она получила известность благодаря находкам ископаемых гоминид, а также более 30 видов других млекопитающих фауны *Stegodon–Ailuropoda*, характерной для второй половины среднего плейстоцена и начала позднего плейстоцена [1–3].

В марте 2020 г. кратковременные раскопки в пещере Лангчанг провел экспедиционный отряд Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН). Материалы извлечены из костеносных плотных карбонатизированных суглинков коричневого цвета, заполняющих восточные галереи пещеры. Остатки млекопитающих представлены в основном коронками зубов; сохра-

нившиеся корни зубов и кости часто несут следы погрызов, оставленные дикобразами.

Возраст фауны млекопитающих пещеры Лангчанг определялся в интервалах 385–185 тыс. л.н. [2] или 80–60 тыс. л.н. [1]; в последнее время уверенно считается позднеплейстоценовым – 100–80 тыс. л.н. [3].

Среди собранных в 2020 г. остатков млекопитающих определены приматы *Pongo* sp. (Pongidae), *Trachypithecus* sp. (Colobidae), *Macaca* cf. *nemestrina* (Linnaeus, 1766), *Macaca* sp. (Cercopithecidae), хищные *Arctonyx collaris rostratus* Matthew et Granger, 1923 (Mustelidae), *Panthera* sp. (Felidae), рукокрылые *Ia io* Thomas, 1902 (Vespertilionidae), грызуны *Hystrix kiangsenensis* Wang, 1931 (Hystricidae), хоботные *Elephas* sp. (Elephantidae), непарнокопытные *Tapirus indicus* (Desmarest, 1819) (Tapiridae) и *Dicerorhinus sumatrensis* (Fischer, 1814) (Rhinocerotidae), парнокопытные *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, *S. barbatus* Müller, 1838 (Suidae), *Tragulus kanchil* (Raffles, 1821) (Tragulidae), *Hydropotes inermis* Swinhoe, 1870, *Muntiacus muntjak* (Zimmermann, 1780), *Axis porcinus* (Zimmermann, 1780), *Rusa unicolor* (Kerr, 1792) (Cervidae) и *Capricornis sumatraensis* (Bechstein, 1799) (Bovidae).

Приматы (рис. 1) представлены орангутаном *Pongo* sp. (C¹, P³, P⁴ и M³), тонкотелом *Trachypithecus* sp. (P₃), макаками *Macaca* cf. *nemestrina* (C¹, M¹,

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

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

³ Институт тропической экологии Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра, Ханой, Вьетнам

*e-mail: alopap@paleo.ru

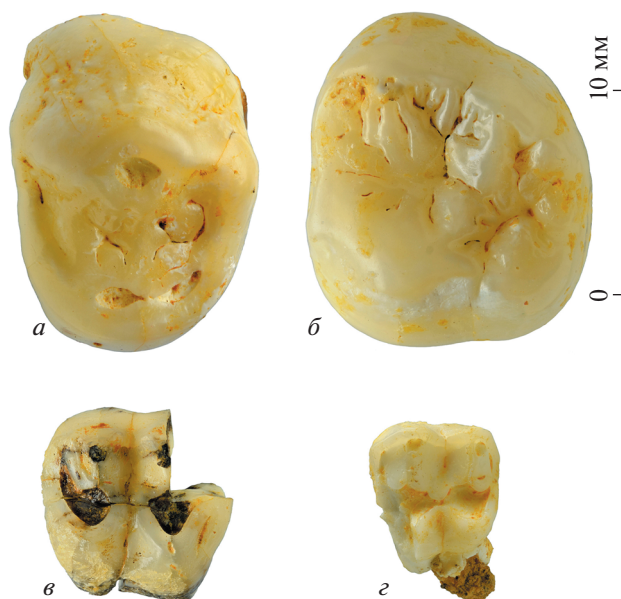


Рис. 1. Приматы из местонахождения Лангчанг: *a, б* – *Pongo* sp.: *a* – экз. ПИН, № 5792/5, правый P^3 с окклюзиальной стороны; *б* – экз. ПИН, № 5792/7, левый M^3 с окклюзиальной стороны; *в* – *Macaca* cf. *nemestrina* (Linnaeus, 1766), экз. ПИН, № 5792/110, правый M^2 с окклюзиальной стороны; *г* – *Macaca* sp., экз. ПИН, № 5792/113, левый M^3 с окклюзиальной стороны; Вьетнам, провинция Тханьхоа, уезд Батхьюк, пещера Лангчанг; верхний плейстоцен.

M^2 , M^3) и *Macaca* sp. (M^3). Ранее среди приматов из пещеры Лангчанг указывались калимантанский орангутан *Pongo pygmaeus* (Linnaeus, 1760), сиаманг *Symphalangus syndactylus* (Raffles, 1821), лангур *Presbytis* sp., гривистый тонкотел *Trachypithecus cristatus* Raffles, 1821 и лапундер *Macaca nemestrina* [1]. Исключая *Pongo*, изображений и характеристики находок не приводилось, поэтому невозможно оценить обоснованность определений. *P. pygmaeus* из пещеры Лангчанг был выделен в подвид *P. p. ciochoni* Schwartz et al., 1995, характеризующийся крупными размерами зубов и особенностями строения I^1 [4]. Учитывая свойственный этому виду полиморфизм, подвидовой статус орангутана из Лангчанга остается предметом дискуссии. Представленные в местонахождении роды мартышкообразных обезьян распространены в Азии с середины плейстоцена до современности [5].

Большой свиной барсук *Arctonyx collaris* Cuvier, 1825 обитает на востоке Индии и в Индокитае. Его ископаемые находки известны из плейстоцена Китая и Юго-Восточной Азии, включая пещеру Лангчанг [1]. Новые материалы (два M^1 , M_1) на основании величины (M^1 , экз. ПИН, № 5792/1: длина (L) – 17.0, ширина (W) – 13.0; M_1 , экз. ПИН, № 5792/2: L – 21.2, W – 7.4) и строения зубов позволяют отнести барсука из Лангчанга к

вымершему подвиду *A. c. rostratus*. Остатки *Panthera* sp. представлены фрагментом клыка. Ранее из рассматриваемого местонахождения были определены леопард *P. pardus* (Linnaeus, 1758) и тигр *P. tigris* (Linnaeus, 1758) [1].

Большой кожан *Ia io* ныне распространен в Непале, на востоке Индии, на юге Китая, в Мьянме, Таиланде, Лаосе и Вьетнаме. В ископаемом состоянии он был ранее известен из плейстоцена Китая [6–9], а во Вьетнаме обнаружен впервые. Материал из пещеры Лангчанг представлен нижнечелюстным фрагментом с молярами.

Из пещеры Лангчанг по изолированным зубам известен крупный дикобраз, идентифицированный как *Hystrix brachyura* Linnaeus, 1758 или *H. indica* Kerr, 1792. На основании анализа морфометрических данных систематическое положение этой формы следует определять как *H. kiangsenensis*.

Elephas sp. представлен одной пластиной верхнего зуба смены DP^4-M^1 . На принадлежность к роду *Elephas* указывают толщина эмали (1.4 мм) и ее сильная складчатость, характерные для *E. maximus* Linnaeus, 1758 [10].

Чепрачный тапир *Tapirus indicus* был ранее указан из пещеры Лангчанг [1]. Единственная находка этого вида в новых сборах – изолированный M_2 (L – 32.6 мм, W – 23.0 мм; рис. 2, *a*). В раннем плейстоцене ареал этого вида включал южный Китай, в среднем плейстоцене – Таиланд, Камбоджу, Лаос, Яву, в позднем плейстоцене – Лаос, Вьетнам, Малакку, Калимантан, Суматру и Яву [3, 11]. Во Вьетнаме и Лаосе в позднем плейстоцене обитал также вымерший гигантский тапир *T. augustus* Matthew et Granger, 1923 [3], который был существенно крупнее *T. indicus*.

Суматранский носорог *Dicerorhinus sumatrensis* был идентифицирован из пещеры Лангчанг по многочисленным остаткам без описания и изображений [1]. Строение и размеры зубов из новых сборов (M_2 : L – 39.5 мм, W – 23.6 мм; M_3 : L – 46.0 мм, W – 26.6 мм; рис. 2, *б–д*) подтверждают отнесение носорога из Лангчанга к *D. sumatrensis*, самому мелкому из современных видов Rhinocerotidae. В ископаемом состоянии этот вид известен из нижнего плейстоцена Мьянмы, среднего плейстоцена южного Китая, верхнего плейстоцена Вьетнама, Малакки, Суматры, Калимантана и Явы [3, 11].

По данным предыдущих исследований, в состав фауны Лангчанг входили пять видов парнокопытных [1]. Присутствие *Sus scrofa*, *Muntiacus muntjak*, *Rusa unicorn* и *Capricornis sumatraensis* подтверждено новыми находками, а остатки *Bubalus bubalis* нами не найдены. *Sus barbatus*, *Tragulus kanchil*, *Hydropotes inermis* и *Axis porcinus* идентифицированы в фауне Лангчанг впервые.

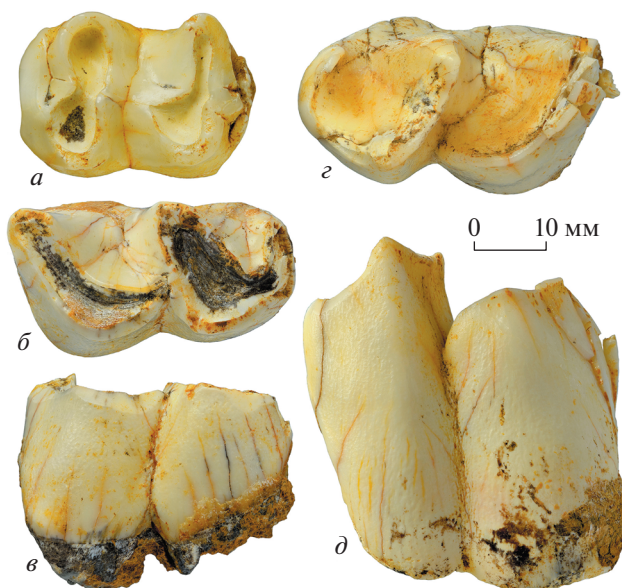


Рис. 2. Непарнокопытные из местонахождения Лангчанг: *a* – *Tapirus indicus* (Desmarest, 1819), экз. ПИН, № 5792/4, левый M_2 с окклюзиальной стороны; *б–д* – *Dicerorhinus sumatrensis* (Fischer, 1814): *б, в* – экз. ПИН, № 5792/38, правый M_2 : *б* – с окклюзиальной стороны, *в* – с лабиальной стороны; *г, д* – экз. ПИН, № 5792/28, левый M_3 : *г* – с окклюзиальной стороны, *д* – с лабиальной стороны; Вьетнам, провинция Тханьхоа, уезд Батхьюк, пещера Лангчанг; верхний плейстоцен.

Бородатая свинья *Sus barbatus* представлена изолированными зубами (C^1 , P^3 , P^4 , M^1 , два M^3 , C_1 , P_1 , P_3 , P_4 , два M_1 , M_2 и M_3). Лабиальная поверхность нижнего клыка самца экз. ПИН, № 5792/29 (рис. 3, *a, б*) шире задней, индексы C_1 по промерам у основания (114.2) и в середине длины (143.8) соответствуют таковым *S. barbatus*. Кроме того, виды *S. barbatus* и *S. scrofa* различаются по очертаниям и морфологии последних моляров. В частности, M^3 у *S. barbatus* менее удлинены, со слабым пентапреконулем и неудлиненным гептаконном (рис. 3, *в*); эмаль на стертых зубах более тонкая и складчатая, чем у *S. scrofa*. Кабан *S. scrofa*, ареал которого охватывает большую часть Евразии и Северную Африку, известен в Юго-Западной Азии с раннего плейстоцена [1]. *S. barbatus* обитает ныне лишь на полуострове Малакка, островах Суматре и Калимантане, а в ископаемом состоянии найден в среднем и верхнем плейстоцене Таиланда, верхнем плейстоцене Лаоса, Вьетнама, Малайзии и Индонезии, включая Суматру, Яву и Калимантан [3], причем в ряде местонахождений, как и в пещере Лангчанг, вместе с кабаном [1, 3, 12, 13].

Малый канчиль *Tragulus kanchil* – архаичное парнокопытное тропических лесов Юго-Восточной Азии, ареал которого ныне охватывает реги-

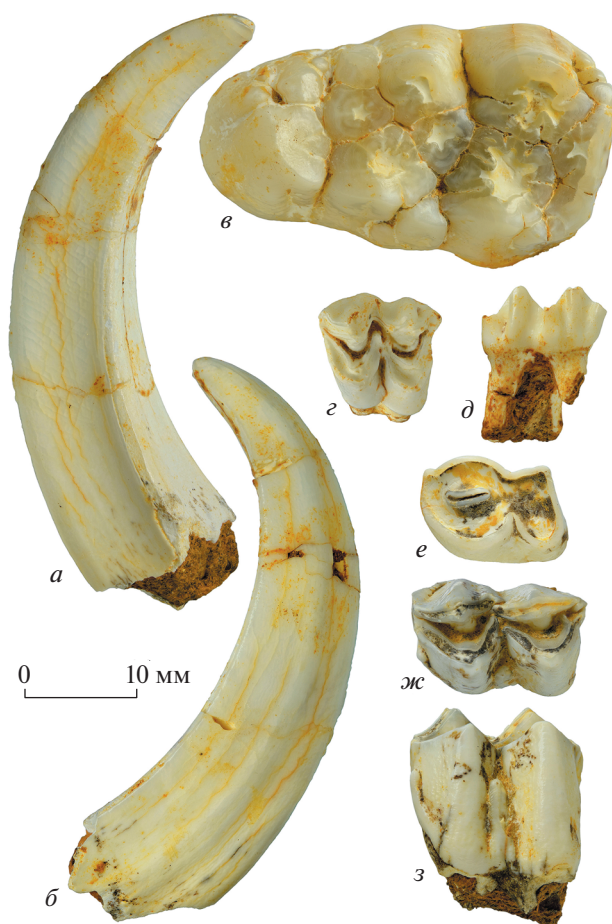


Рис. 3. Парнокопытные из местонахождения Лангчанг: *a–в* – *Sus barbatus* Müller, 1838: *a, б* – экз. ПИН, № 5792/29, самец, левый C_1 : *a* – с лабиальной стороны, *б* – с лингвальной стороны; *в* – экз. ПИН, № 5792/40, правый M^3 с окклюзиальной стороны; *г, д* – *Tragulus kanchil* (Raffles, 1821), экз. ПИН, № 5792/42, левый M^3 : *г* – с окклюзиальной стороны, *д* – с лабиальной стороны; *е* – *Hydropotes inermis* Swinhoe, 1870, экз. ПИН, № 5792/20, левый P_4 с окклюзиальной стороны; *ж, з* – *Axis porcinus* (Zimmermann, 1780), экз. ПИН, № 5792/12, левый M_2 : *ж* – с окклюзиальной стороны, *з* – с лабиальной стороны; Вьетнам, провинция Тханьхоа, уезд Батхьюк, пещера Лангчанг; верхний плейстоцен.

он приблизительно от 18° с.ш. до Суматры, Калимантана и Зондских островов. Этот вид представлен единственным M^3 (L – 10.6 мм, W – 12.8 мм; рис. 3, *г, д*).

Водяной олень *Hydropotes inermis* идентифицирован по находке премоляра P_4 (рис. 3, *е*) с характерным строением (расширенный метаконид и закрытые лингвально передняя и задняя долилки) и соответствующими размерами (L – 11.5 мм, W – 8.1 мм). Вид обитает в Корее и на востоке Китая (в бассейне р. Янцзы). В Китае он распространен с раннего плейстоцена (в том числе в Чжоукоудяне), в историческое время обитал и на юге

страны (вплоть до Гуандуна, Гуанси и Тайваня). В Юго-Восточной Азии обнаружен впервые.

Свиной олень *Axis porcinus* (= *Huelaphus porcinus*) представлен двумя щечными зубами (P₄, экз. ПИН, № 5792/115: L – 15.0 мм, W – 9.4 мм; M₂, экз. ПИН, № 5792/12: L – 15.6 мм, W – 11.0 мм; рис. 3, ж, з). Ареал вида ныне простирается от Пакистана, вдоль предгорий Гималаев, через Непал, Индию и Мьянму до южного Вьетнама и Камбоджи. Ранее вид обитал и в Китае. В Юго-Восточной Азии он встречается со среднего плейстоцена.

Кроме того, в пещере Лангчанг сделаны новые находки красного мунтжака *Muntiacus muntjak* (два P², три M³, M₁, три M₃; M³, экз. ПИН, № 5792/10: L – 13.4 мм, W – 16.3 мм), индийского замбара *Rusa unicolor* (два P³, M³, P₄, M₃; M³, экз. ПИН, № 5792/3: L – 23.8 мм, W – 25.6 мм) и сероу *Capricornis sumatraensis* (неполный M³, P₃, P₄, M₃; P₄, экз. ПИН, № 5792/49: L – 14.7 мм, W – 9.5 мм; M₃, экз. ПИН, № 5792/21: L – 22.2 мм, W – 9.7 мм). Красный мунтжак ныне присутствует в Таиланде, на юге Мьянмы, во Вьетнаме и на Больших Зондских островах. Замбар распространен на Индийском субконтиненте, юге Китая и в Юго-Восточной Азии (в Мьянме, Таиланде, Лаосе, Камбодже, Вьетнаме и Малайзии). Эти крупные олени широко представлены в континентальной части Юго-Восточной Азии со среднего плейстоцена, а в позднем плейстоцене расселились и на Большие Зондские острова [3]. Сероу *C. sumatraensis* обитает в горных районах от Восточного Тибета и Северной Индии до южного Китая и Юго-Восточной Азии (вплоть до Суматры). В Китае присутствует с раннего плейстоцена, а в Юго-Восточной Азии – со среднего плейстоцена [1, 3].

Ассоциация парнокопытных из пещеры Лангчанг по составу близка к сообществам конца среднего – начала позднего плейстоцена Таиланда и Лаоса. Ее состав отражает возможные зоогеографические связи как с плейстоценовыми фаунами Пакистана и Индии, так и с фаунами южного Китая. Наряду с автохтонами (бородатая свинья и малый канчиль) присутствуют виды, которые могли распространиться в регион с запада или севера (свиной олень, красный мунтжак, замбар и сероу) и с севера (водяной олень). В комплексе млекопитающих в целом преобладают обитатели разнообразных тропических лесов (от равнинных до горных), которые ныне селятся вблизи рек, в прибрежных и холмистых районах, а также представлены субтропические формы. Значительная часть парнокопытных предпочитает увлажненные и заболоченные места (свинья, водяной олень, свиной олень), а некоторые виды – и мангровые заросли (бородатая свинья и малый канчиль). Часть видов адаптирована к более су-

хим ландшафтам (сероу) или относительно широкому спектру местообитаний (кабан, замбар).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках работ Совместного Российско-Вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (Тропического центра), проект Э-1.4 “Состав фауны приматов (Cercopithecidae, Pongidae) и грызунов (Rodentia) плейстоцена и голоцена Вьетнама как индикатор изменения экологических условий”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны А.Н. Кузнецову, С.П. Кузнецовой, всем вьетнамским коллегам (Тропический центр) и А.А. Лозовскому (ПИН) за помощь в экспедиционных работах, а также А.М. Кузнецову и С.В. Багирову (ПИН) за помощь в подготовке фотографий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Long V.T., De Vos J., Ciochon R.L. The fossil mammal fauna of the Lang Trang caves, Vietnam, compared with Southeast Asian fossil and recent mammal faunas: the geographical implications // Bulletin of the Indo-Pacific Prehistory Association. 1996. V. 14. P. 101–109.
2. Ciochon R.L. Divorcing hominins from the *Stegodon-Ailuropoda* fauna: new views on the antiquity of hominins in Asia. In: Fleagle J.G., Shea J.J., Grine F.E., et al., editors. Out of Africa I: the first hominin colonization of Eurasia. Cambridge, Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer; 2010. P. 111–126.
3. Suraprasit K., Jaeger J.-J., Chaimanee Y., et al. The Middle Pleistocene vertebrate fauna from Khok Sung (Nakhon Ratchasima, Thailand): biochronological and paleobiogeographical implications // ZooKeys. 2016. V. 613. P. 1–157.
4. Schwartz J.H., Long V.T., Cuong N.L., et al. A review of the Pleistocene hominoid fauna of the Socialist Republic of Vietnam // Anthropological Papers of the American Museum of Natural History. 1995. № 76. P. 1–24.
5. Jablonski N.G. Fossil Old World monkeys. The late Neogene radiation. In: The primate fossil records. Yartwig W.C., editor. Cambridge University Press; 2002. P. 311–338.
6. Young C.C. On the Insectivora, Chiroptera, Rodentia and Primates other than *Sinanthropus* from Locality 1 at Choukoutien // Palaeontologia Sinica. Ser. C. 1934. V. 8, № 3. P. 30–41.
7. Chang Y. Pleistocene mammals from Shaochin, Kwantung // Paleovertebrata et Paleoanthropologia. 1959. V. 1. № 3. P. 141–144.
8. Kowalski K., Li C. Remarks on the fauna of bats (Chiroptera) from Locality 1 at Choukoutien // Vertebrata Palasiatica. 1963. V. 7. № 2. P. 83–118.
9. Qiu Z., Li C., Hu S. Late Pleistocene micromammal fauna of Sanjacun, Kunming // Vertebrata Palasiatica. 1984. V. 22. № 4. P. 281–293.

10. *Мащенко Е.Н., Кузнецов Г.В.* Морфология зубов азиатского слона (*Elephas maximus*) Южного Вьетнама // Зоологический журнал. 2014. Т. 93. № 2. С. 259–273.
11. *Cranbrook, Earl of, Piper P.J.* Paleontology to policy: the Quaternary history of Southeast Asian tapirs (Tapi-ridae) in relation to large mammal species turnover, with a proposal for conservation of Malayan tapir by re-introduction to Borneo // Integrative Zoology. 2013. V. 8. № 1. P. 95–120.
12. *Bacon A.-M., Demeter F., Düringer P., et al.* The Late Pleistocene Duoi U’Oi cave in northern Vietnam: palaeontology, sedimentology, taphonomy and palaeoenvironments // Quaternary Science Reviews. 2008. V. 27. № 15–16. P. 1627–1654.
13. *Bacon A.-M., Demeter F., Tougard C., et al.* Redécouverte d’une faune pléistocène dans les remplissages karstiques de Tam Hang au Laos: premiers résultats // Comptes Rendus Palevol. 2008. V. 7. № 5. P. 277–288.

PLEISTOCENE MAMMALS FROM THE LANG TRANG CAVE (VIETNAM): NEW DATA

Academician **A. V. Lopatin^{a,#}**, **E. N. Maschenko^{a,b}**, **I. A. Vislobokova^a**,
N. V. Serdyuk^{a,b}, and **Le Xuan Dac^c**

^a *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

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

^c *Institute of Tropical Ecology of the Joint Russian-Vietnamese Tropical Scientific and Technological Center, Hanoi, Vietnam*

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

The following mammal assemblage is determined among the materials collected in 2020 from the Pleistocene of Lang Trang cave, northern Vietnam: primates *Pongo* sp., *Trachypithecus* sp., *Macaca* cf. *nemestrina* (Linnaeus, 1766) and *Macaca* sp., carnivorans *Arctonyx collaris rostratus* Matthew et Granger, 1923 and *Panthera* sp., a bat *Ia io* Thomas, 1902, a rodent *Hystrix kiangsenensis* Wang, 1931, a proboscidean *Elephas* sp., perissodactyls *Tapirus indicus* (Desmarest, 1819) and *Dicerorhinus sumatrensis* (Fischer, 1814), artiodactyls *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, *S. barbatus* Müller, 1838, *Tragulus kanchil* (Raffles, 1821), *Hydropotes inermis* Swinhoe, 1870, *Muntiacus muntjak* (Zimmermann, 1780), *Axis porcinus* (Zimmermann, 1780), *Rusa unicolor* (Kerr, 1792) and *Capricornis sumatraensis* (Bechstein, 1799). *I. io*, *S. barbatus*, *T. kanchil*, *H. inermis*, and *A. porcinus* are recorded for the first time in the Lang Trang fauna. The mammal assemblage is dominated by inhabitants of tropical forests (from plains to mountains), also subtropical forms are present.

Keywords: Mammalia, Primates, Carnivora, Chiroptera, Rodentia, Proboscidea, Perissodactyla, Artiodactyla, Pleistocene, Lang Trang cave, Vietnam

УДК 569.742.6:551.793(477.75)

ГИГАНТСКАЯ ГИЕНА *PACHYCROCUTA BREVIROSTRIS* (HYAENIDAE, CARNIVORA) ИЗ НИЖНЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА, КРЫМ

© 2021 г. А. В. Лавров^{1,*}, Д. О. Гимранов², Д. Б. Старцев³, академик РАН А. В. Лопатин¹

Поступило 22.06.2020 г.

После доработки 15.07.2020 г.

Принято к публикации 15.07.2020 г.

Из раннеплейстоценового местонахождения в пещере Таврида (Крым, поздний виллафранк, возраст 1.8–1.5 млн. лет) описаны зубы гигантской гиены *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850). Этот вид был типичным представителем виллафранкской фауны Восточного Средиземноморья. Пещера Таврида периодически использовалась гиенами и другими хищниками как логово и убежище.

Ключевые слова: *Pachycrocuta brevirostris*, поздний виллафранк, пещера Таврида, Крым, премоляры, клыки

DOI: 10.31857/S2686738921010169

В “Логове гиен”, ответвлении южного коридора пещеры Таврида в Крыму, была найдена основная часть костей крупных позвоночных позднего виллафранка (псекупский комплекс, MNQ18–MNQ19) [1, 2]. В составе ассоциации млекопитающих были обнаружены представители Carnivora – Felidae, Hyaenidae, Ursidae и Canidae [1, 3]. Пещера в поздневиллафранкское время соединялась с дневной поверхностью через горизонтальный южный коридор – в склоне долины р. Зуя был вход в пещеру. Это открывало животным доступ в пещеру, и она могла использоваться хищниками как логово [4].

К Hyaenidae отнесены верхний резец I3 (экз. ПИН, № 5644/83), три верхних клыка C1 (экз. ПИН, №№ 5644/75–77), верхний премоляр P3 (экз. ПИН, № 5644/82), задняя часть верхнего хищнического зуба P4 (экз. ПИН, № 5644/79; метастиллярный выступ с задним корнем), нижний клык c1 (экз. ПИН, № 5644/84), два нижних премоляра p2 (экз. ПИН, №№ 5644/78, 81), фрагмент горизонтальной ветви нижней челюсти с альвеолами зубов, когтевая фаланга, фрагменты зубов и многочисленные копролиты. Описанные в статье

изолированные зубы (рис. 1–3) хранятся в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН, Москва (ПИН).

Принятые в статье сокращения: L – длина; Lmtst – длина метастиллярной доли; W – ширина; Wmtst – ширина метастиллярной доли.

Сравнение находок из пещеры Таврида с материалами по другим ископаемым гиенам этого времени [5, 6] позволяет заключить, что крымские находки принадлежат гигантской гиене *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850). Зубы большие и массивные (отношение W/L), крупнее, чем у других Hyaenidae из плиоцена – раннего плейстоцена Европы и Средиземноморского региона (рис. 3). Близкие по размерам и массивности элементы зубного аппарата (включая массивность и высоту горизонтальной ветви нижней челюсти) имеет обитавшая в этом же регионе *Pliocrocuta* [7]. Однако роды *Pachycrocuta* и *Pliocrocuta* можно различить по форме премоляров. Форма P2–P3 и p2–p4 с окклюзионной стороны у *Pachycrocuta*, как правило, субквадратная, а у *Pliocrocuta* – ромбовидная [8]. Кроме того, у *Pachycrocuta* передние базальные бугорки премоляров зачаточные, маленькие, сильно смещены лингвально от продольной оси зуба [9], тогда как у *Pliocrocuta* они крупнее и расположены на продольной оси зуба. С учетом указанных признаков материал из Тавриды отнесен к *Pachycrocuta brevirostris*.

I3 (экз. ПИН, № 5644/83) очень крупный, массивный (рис. 1). Его вершина сильно стерта. Мезиальный бугорок маленький, дистальный бугорок, судя по конфигурации поверхности зуба в

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

² Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

³ Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

*e-mail: lavrov_av@inbox.ru



Рис. 1. *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850): экз. ПИН, № 5644/83, левый I3 с окклюзиальной (вверху слева) и буккальной (вверху справа) сторон; экз. ПИН, № 5644/79, фрагмент левого P4 с лабиальной (в середине слева, прорисованы реконструированные контуры зуба) и окклюзиальной (в середине справа) сторон; экз. ПИН, № 5644/81, правый p2 с лингвальной (внизу слева) и окклюзиальной (внизу справа) сторон; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

соответствующей части (из-за стирания сохранилось только основание лабиального бугорка), тоже был маленьким.

S1 (экз. ПИН, №№ 5644/75, 76, 77) демонстрируют отличительную черту верхних клыков Hyaenidae — наличие плоской треугольной передней площадки с ориентированной вентрально вершиной угла между ее длинными сторонами (рис. 2). Площадка представляет собой выступ эмали у основания краниальной поверхности коронки, дорсальнее переднего режущего гребня клыка. Передний режущий гребень хорошо выражен, расположен точно на переднезадней оси зуба. Задний режущий гребень также расположен на этой оси (сохранился только на экз. ПИН, № 5644/75). Клыки прямые, длинная ось корня является продолжением оси коронки, только дорсальная треть корня немного отклоняется от оси зуба каудально.

Коронка с1 (экз. ПИН, № 5644/84) прямая, массивная, значительно стертая у вершины и по

каудальному краю. На лабиальной поверхности коронки, ближе к ее заднему краю, находится фасетка стирания от контакта с верхним клыком. Фасетка сильно удлинена дорсовентрально (размер 17×5 мм). Передний режущий гребень сильно смещен к лингвальной стороне коронки (рис. 2). Особенностью зуба является то, что размеры корня в средней части его длины больше размеров основания коронки по обеим осям (L и W). Корень зуба прямой, вершина корня не отклоняется назад от продольной оси зуба, в отличие от верхних клыков.

P3 (экз. ПИН, № 5644/82) с окклюзиальной поверхностью округленно-квадратных очертаний (рис. 3). Передний базальный бугорок маленький, плотно прижат к главному бугорку и сильно смещен лингвально, частично стерт. Задний бугорок маленький, с коротким режущим лезвием. Коронка в передней части чуть шире, чем в задней. Лабиальный цингулюм хорошо развит вплоть до заднего края зуба. Лингвальный

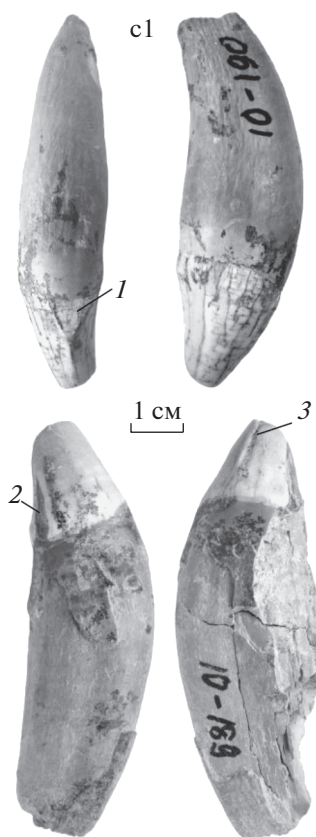


Рис. 2. *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850): экз. ПИН, № 5644/76, правый С1 с передней (вверху слева) и лабиальной (вверху справа) сторон; экз. ПИН, № 5644/84, правый с1 с лабиальной (внизу слева) и лингвальной (внизу справа) сторон; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: 1 – треугольный эмалевый выступ; 2 – фасетка стирания; 3 – передний режущий гребень.

цингулюм очень мощный и выражен вдоль всего лингвального края коронки. Задний корень заметно больше переднего по длине. Изначальная сильная морщинистость эмали на латеральной поверхности зуба слабо заметна из-за значительного износа (как и на р2, см. ниже). Зуб очень крупный в сравнении с Р3 *P. brevirostris* из других местонахождений (рис. 3), по длине несколько превосходит самый крупный экземпляр из Унтермасфельда, Германия [10].

Р4 (экз. ПИН, № 5644/79) сильно стерт и разрушен, сохранились метастилярная часть зуба и задний корень (рис. 1). Судя по фрагменту, это очень крупный экземпляр, крупнее образца из местонахождения Кисляковская (Краснодарский край, экз. ПИН, № 791/1). В метастилярной части Р4 гиен имеют сходство с Р4 саблезубых кошек, однако у *hyaenidae* (*Pachycrocuta*, *Adcrocuta*, *Crocuta*, *hyaena*) зуб в этой части заметно шире и массивнее, чем у *Machairodontinae* (*Megantereon*, *Homotherium*) [11]. Размеры метастилярной части Р4 (экз. ПИН, № 5644/79) из пещеры Таврида: Lmtst – 16.4, Wmtst – 14.1; эти значения выше средних для вида [10].

Коронка р2 (экз. ПИН, № 5644/81) очень массивная. Передний базальный бугорок маленький, плотно прижат к главному бугорку и смещен лингвально от продольной оси зуба (рис. 1). Задний бугорок конический, четко отделен от главного бугорка хорошо выраженными бороздками. Коронка слабо расширяется каудально. Лабиальный цингулид хорошо развит вплоть до заднего края переднего корня. Лингвальный цингулид очень мощный и выражен вдоль всей лингвальной стороны коронки. Задний корень заметно больше переднего в поперечном сечении. Сильная морщинистость латеральной поверхности эмали сохранилась частично.

Описанные зубы (кроме клыков) стерты примерно в одинаковой степени, имеют одинаковую сохранность. Можно предполагать, что охарактеризованные выше I3, Р3, фрагмент Р4 и р2 принадлежали одной очень крупной особи – их размеры являются одними из наибольших среди находок из всех местонахождений Евразии [10, 12, 13]. Три верхних клыка принадлежали разным крупным особям, а нижней клык – еще одной

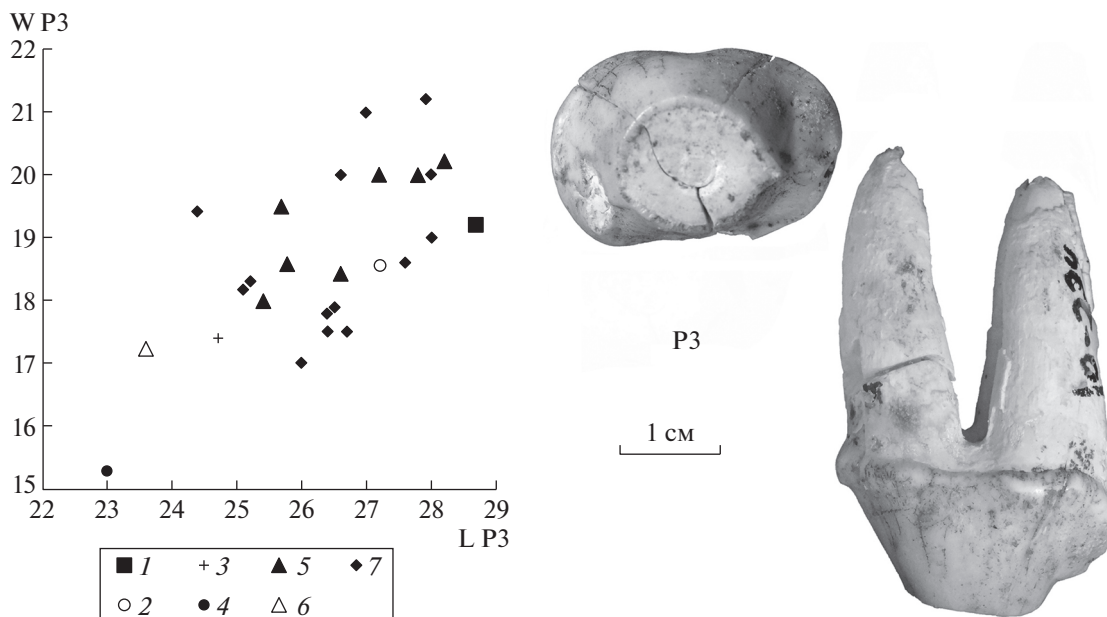


Рис. 3. *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850): экз. ПИН, № 5644/88, левый P3 с окклюзиальной (в середине) и лабиальной (справа) сторон; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен; сравнение размеров P3 (L – длина коронки, W – ширина коронки, в мм) *P. brevirostris* из разных частей ареала (слева). Обозначения: 1 – пещера Таврида, Крым, Россия; 2 – Удунга, Забайкалье, Россия; 3 – Кисляковская, Краснодарский край, Россия (ПИН); 4 – пещера Виктория, Мурсия, Испания [13]; 5 – Унтермасфельд, Германия; 6 – Кромдаай А, ЮАР; 7 – другие местонахождения [10].

мелкой особи (его размеры наименьшие из известных для вида).

Pachycrocuta brevirostris была важным членом сообщества хищных млекопитающих псекупского фаунистического комплекса. Она была приблизительно на 20–30% крупнее современной африканской пятнистой гиены *Crocuta crocuta* (Erxleben, 1777) и занимала вершину пищевой пирамиды [14]. Гигантские гиены время от времени использовали пещеру Таврида как логово, на что указывают обнаруженные в пещере копролиты гиен. Видимо, это происходило в периоды, когда пещера не использовалась с той же целью саблезубыми [1] и другими крупными хищниками [3].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта РФФИ № 19-05-00982.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность всем участникам раскопок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др. Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
2. Вислобокова И.А., Тимов В.В., Лавров А.В., и др. Раннеплейстоценовые винторогие антилопы (*Agtiodyctyla*, Bovidae) из пещеры Таврида (Крым, Россия) // Палеонтологический журнал. 2020. № 1. С. 78–88.
3. Гимранов Д.О., Лавров А.В., Старцев Д.Б., и др. Первая находка этрусского медведя (*Ursus etruscus*, Ursidae, Carnivora) в Крыму (пещера Таврида, ранний плейстоцен) // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 491. № 1. С. 130–133.
4. Оксиненко П.В., Лавров А.В. История формирования пещеры Таврида – памятника фауны позвоночных позднего виллафранка // Вестник МГУ. Сер. геогр. 2021. № 1 (в печати).
5. Werdelin L., Solounias N. The Hyaenidae: taxonomy, systematics and evolution // Fossils Strata. 1991. № 30. P. 1–104.
6. Барышников Г.Ф., Верещагин Н.К. Краткий обзор четвертичных гиен (семейство Hyaeonidae) России и сопредельных территорий // Труды Зоологического института РАН. 1996. Т. 270. С. 7–65.
7. Baryshnikov G.F., Tsoukala E. New analysis of the Pleistocene carnivores from Petralona Cave (Macedonia, Greece) based on the collection of the Thessaloniki Aristotle University // Geobios. 2010. V. 43. № 4. P. 389–402.
8. Tseng Z.J., Wang X., Li Q., Xie G. Pliocene bone-cracking Hyaeoninae (Carnivora, Mammalia) from the Zanda

- Basin, Tibet Autonomous Region, China // *Historical Biology*. 2016. V. 28. № 1–2. P. 69–77.
9. Сотникова М.В., Байгушева В.С., Титов В.В. Хищные млекопитающие ханпровского фаунистического комплекса и их стратиграфическое значение // Стратиграфия. Геологическая корреляция. 2002. Т. 10. № 4. С. 62–78.
 10. Turner A., Anton M. The giant hyaena, *Pachycrocuta brevirostris* (Mammalia, Carnivora, Hyaenidae) // *Geobios*. 1996. V. 29. № 4. P. 455–468.
 11. Vislobokova I.A., Agadjanian A.K. New data on large mammals of the Pleistocene Trilica fauna, Montenegro, the Central Balkans // *Paleontological Journal*. 2015. V. 49. № 6. P. 651–667.
 12. Qiu Z.-X. Die Hyaeniden aus dem Ruscinium und Villafranchium Chinas // *Munchner Geowissenschaftliche Abhandlungen*. 1987. V. 9. P. 1–108.
 13. Madurell-Malapeira J., Morales J., Vinuesa V.V., et al. Úrsidos, hiénidos y félidos del Pleistoceno inferior de Cueva Victoria (Cartagena, Murcia) // *Mastia: Revista del Museo Arqueológico Municipal del Cartagena*. 2012–2014. № 11–13. P. 401–433.
 14. Turner A. Remains of *Pachycrocuta brevirostris* (Carnivora, Hyaenidae) from the lower Pleistocene site of Untermassfeld. In: Kahlke R.D., editor. *Das Pleistozän von Untermassfeld bei Meiningen (Thüringen)*. Heidelberg: Propylaeum; 2001. P. 673–690.

GIANT HYENA *PACHYCROCUTA BREVIROSTRIS* (HYAENIDAE, CARNIVORA) FROM THE LOWER PLEISTOCENE OF TAURIDA CAVE, CRIMEA

A. V. Lavrov^{a, #}, D. O. Gimranov^b, D. B. Startsev^c, and Academician A. V. Lopatin^a

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

^b Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

[#]e-mail: lavrov_av@inbox.ru

The dental remains of a giant hyena *Pachycrocuta brevirostris* (Gervais, 1850) from the Early Pleistocene locality of the Taurida cave (Crimea, Late Villafranchian, 1.8–1.5 Ma) are described. This species was a typical representative of the Villafranchian fauna of the Eastern Mediterranean. The Taurida cave was periodically used by hyenas and other carnivorans as a den and retreat.

Keywords: *Pachycrocuta brevirostris*, Late Villafranchian, Taurida cave, Crimea, premolars, canines

УДК 567.433:591.471.31

О ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЯХ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЛЬЕФА ЭКЗОСКЕЛЕТА РАННИХ ПОЗВОНОЧНЫХ (OSTEOSTRACI, AGNATHA) НА ПЛОСКОСТИ

© 2021 г. О. Б. Афанасьева^{1,*}

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 29.07.2020 г.

После доработки 28.09.2020 г.

Принято к публикации 30.09.2020 г.

Исследование разнообразия скульптуры и гистологического строения экзоскелета у различных таксонов костнопанцирных бесчелюстных (Osteostraci, Agnatha) впервые позволило охарактеризовать основные элементы (геометрические модули) плоскостной организации сложного рельефа на поверхности панциря этой группы ранних позвоночных. Анализ проведен с использованием циркулярной модели построения рельефа твердых покровов, ее применимость показана на примере уникального материала, viz., – фрагментов панциря остеострака *Oeselaspis pustulata* (Patten, 1931) из сибурийских отложений архипелага Северная Земля (Россия).

Ключевые слова: ранние позвоночные, бесчелюстные, палеозой, экзоскелет, морфогенез, геометрия рельефа

DOI: 10.31857/S2686738921010030

Костнопанцирные бесчелюстные (остеостраки) – одна из древнейших групп позвоночных, существовавшая во временном интервале с раннего силура до позднего девона и обладавшая хорошо развитым панцирем (экзоскелетом). Твердые покровы этой группы ранних позвоночных демонстрируют чрезвычайное разнообразие поверхностного рельефа и гистологического строения [1–5] и являются ценным материалом для изучения базовых закономерностей морфогенеза экзоскелета позвоночных.

У позвоночных образование дентина приурочено к границе эпидермиса и дермы. Дентиновые структуры образуются в верхнем кориуме центростремительно от эпидермиса по направлению к формирующимся костным тканям. Представим проекции зачатков дентиновых структур на плоскость как точки (заостренные бугорки), круги разного диаметра (бугорки соответствующих размеров), соприкасающиеся круги (ретикулярные структуры) и перекрывающиеся круги (пористые поверхности), наложение кругов соответствует формированию гладкой поверхности экзоскелета [6]. Базируясь на этих условиях, рассмотрим случаи формирования сложного рельефа, а именно,

твердых структур конкретного типа у остеостраков.

Для понимания процессов формирования твердых структур панциря на плоскости воспользуемся двумерной координатной сеткой с длиной ячейки L . Введем параметр времени и рассмотрим *одновременную* закладку твердых структур.

Совместим проекцию зачатка заостренного бугорка, а именно, точку с узлом координатной сетки (рис. 1, *A*). Соседние бугорки (точки) разместим равноудаленно от центрального бугорка и друг от друга на расстоянии L . Число таких бугорков может быть произвольным, для наглядности схемы возьмем минимальное количество периферических бугорков, а именно, четыре, разместив их в узлах координатной сети (рис. 1, *AI*). Согласно циркулярной модели, при увеличении площади дентиновой поверхности зачатков бугорков будет увеличиваться диаметр d соответствующих им проецируемых на плоскость кругов. Тогда при радиусе центрального круга меньше, чем длина ячейки ($r < L$, т.е. при диаметре $d < 2L$, так как $d = 2r$), будет формироваться центральный бугорок, окруженный периферическими бугорками (рис. 1, *AI–4*). При радиусе центрального круга, равном длине ячейки ($r = L$), зачатки бугорков сольются в единую структуру (рис. 1, *A5*), формируя круглый в сечении бугорок.

Если диаметр кругов, соответствующих проекциям периферических бугорков, будет равен по-

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

*e-mail: oafan@paleo.ru

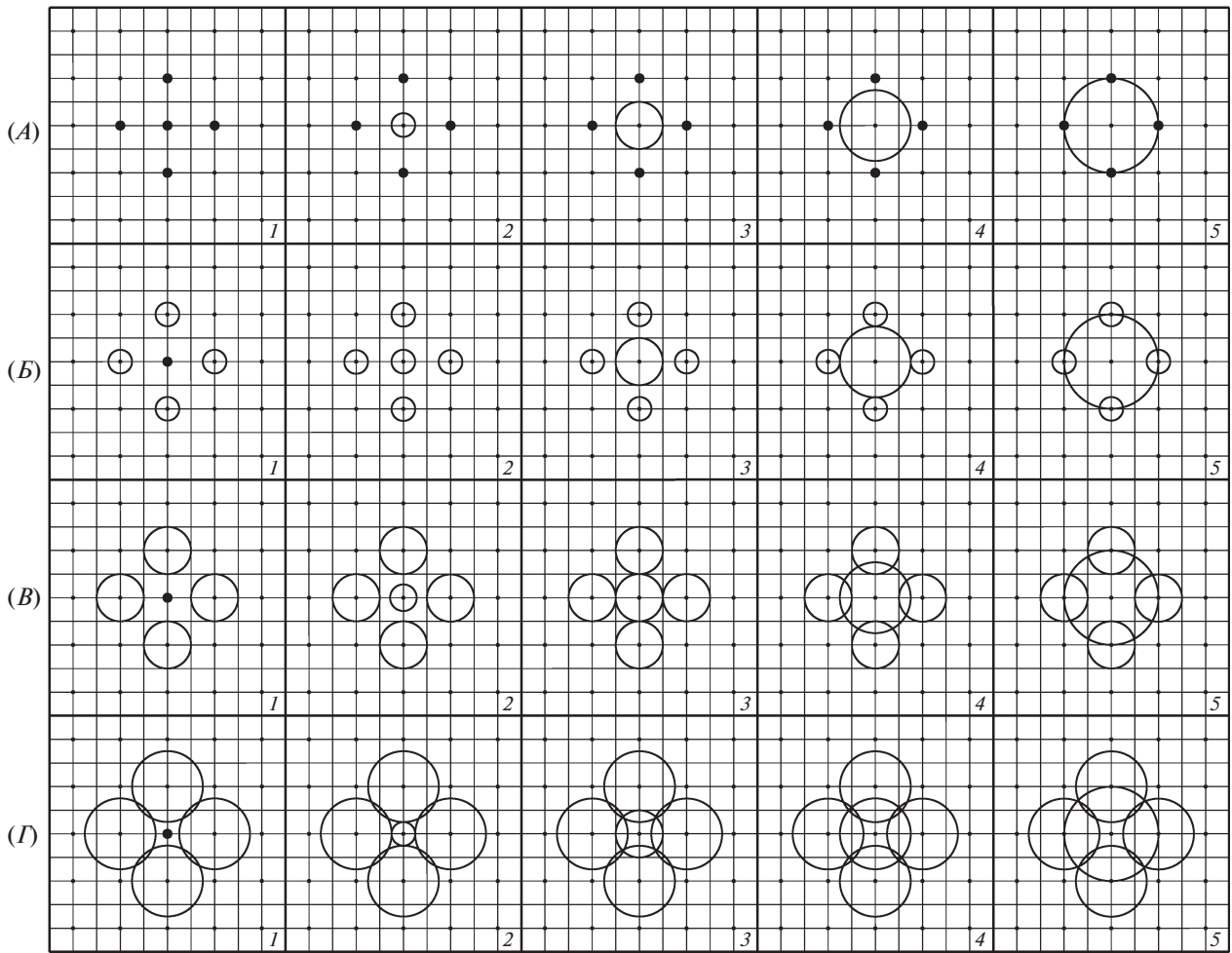


Рис. 1. Основные элементы (модули) плоскостной организации рельефа различного типа на поверхности экзоскелета; периферические бугорки: (А) 1–5 – заостренные, (Б) 1–5 – мелкие; (В) 1–5 – средние; (Г) 1–5 – крупные; точки – заостренные бугорки, круги – бугорки разного диаметра, соприкосновение кругов – ретикулярные структуры, пересечение кругов – поры разного диаметра, наложение кругов – сплошная поверхность экзоскелета (пояснения в тексте).

ловине длины ячейки ($d = 1/2L$), могут быть сформированы следующие рельефы (рис. 1, Б). При диаметре центрального круга меньше, чем полторы длины ячейки ($d < 1\frac{1}{2}L$, т.е. при $r < 3/4L$), будет формироваться центральный бугорок, окруженный периферическими бугорками (рис. 1, Б1–3). Увеличение диаметра центрального круга на схеме приводит к его соприкосновению (взаимному точечному пересечению) с периферическими кругами. Тогда при диаметре центрального круга, равном полторы длины ячейки ($d = 1\frac{1}{2}L$, т.е. при $r = 3/4L$), будет сформирован бугорок сложной формы, с более крупной центральной частью и меньшими периферическими частями (рис. 1, Б4). При диаметре центрального круга, стремящемся к двум с половиной длинам ячейки ($d \rightarrow 2\frac{1}{2}L$, т.е. $r \rightarrow 1\frac{1}{4}L$) будет сформирован бугорок с более или менее обозначенными

периферическими выступами (рис. 1, Б5). При диаметре центрального круга, равном двум с половиной длинам ячейки ($d = 2\frac{1}{2}L$, т.е. $r = 1\frac{1}{4}L$) зачатки структур сольются, формируя круглый в сечении бугорок.

Если диаметр кругов, соответствующих периферическим бугоркам, будет равен длине ячейки ($d = L$), возможно формирование следующих рельефов (рис. 1, В). При диаметре центрального круга меньше длины ячейки ($d < L$, т.е. при $r < 1/2L$) образуются разноразмерные бугорки, окруженные кольцом относительно крупных периферических бугорков (рис. 1, В1–2). При диаметре центрального круга, равном длине ячейки ($d = L$, т.е. при $r = 1/2L$), произойдет соприкосновение кругов (точечное пересечение) так, что будет образована закладка бугорка крестообразной формы с равновеликими частями (рис. 1, В3). При дальнейшем

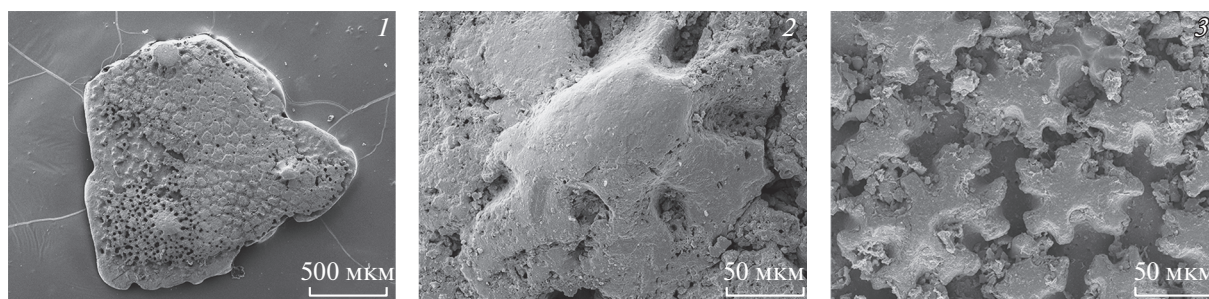


Рис. 2. Экзоскелет *Oeselaspis pustulata*, нижний силур, венлок, о-в Пионер архипелага Северная Земля, Россия: (1) общий вид скульптуры на фрагменте панциря (ПИН 4765/65), масштаб 0.5 мм; (2) крупный центральный бугорок, там же; (3) иррегулярные бугорки, окружающие центральный (ПИН 4765/66), 2, 3 – масштаб 50 мкм.

увеличении площади центрального круга с условием, что его диаметр стремится к трем длинам ячейки ($d \rightarrow 3L$, т.е. $r \rightarrow 1\frac{1}{2}L$), образуются закладки бугорков с более или менее выраженными выступами (рис. 1, B4–5). При диаметре центрального круга, равном трем длинам ячейки закладки отдельных бугорков, сливаются, образуя круглый в сечении бугорок.

Если диаметр кругов, соответствующих периферическим бугоркам, будет равен полутора длинам ячейки ($d = 1\frac{1}{2}L$), будут формироваться следующие рельефы (рис. 1, Г). При диаметре центрального круга меньше половины длины ячейки ($d < 1/2L$, т.е. при $r < 1/4L$) будет закладываться мелкий центральный бугорок, окруженный кольцом, образованным слившимися крупными бугорками (рис. 1, Г1). При диаметре центрального круга, равном половине длины ячейки ($d = 1/2L$, т.е. при $r = 1/4L$), произойдет соприкосновение (точечное пересечение) кругов и слияние всех бугорков в единую структуру так, что между ними останутся относительно мелкие поры (рис. 1, Г2). Дальнейшее увеличение площади центрального круга приведет к наложению кругов друг на друга с образованием единой закладки бугорка крестообразной формы (при условии существования четырех периферических кругов) с более или менее обозначенными выступами (рис. 1, Г3–5). При увеличении количества периферических кругов происходит сглаживание выступов и формирование округлого в сечении относительно крупного бугорка.

Рассмотрим конкретный пример экзоскелета остеострака, для которого характерен поверхностный рельеф сложной организации. Так, у силурийского остеострака *Oeselaspis pustulata* (Patten, 1931), известного из отложений верхнего венлока – нижнего лудлова о. Сааремаа (Эстония) и о-в Октябрьской Революции и Пионер архипелага Северная Земля (Россия) на поверхности панциря размещены бугорки разного типа: как простой округлой, так и сложной иррегулярной формы. Скульптура и гистология его экзоскелета описаны в деталях на основании изучения шли-

фов, фрагментов панциря в СЭМ, а также, частично, с помощью компьютерной томографии [2–5, 7–9].

Относительно крупные (диаметром до 250 мкм) бугорки расположены в центре полигональных полей на возвышениях, имеют полого закругленную блестящую вершину (рис. 2, 1–2). Многочисленные мелкие (40–75 мкм) бугорки расположены между центральными бугорками, иррегулярные или звездообразные – в сечении (рис. 2, 3). Верхняя часть крупных бугорков сложена относительно толстым слоем мезодентина *sensu* [10].

Согласно циркулярной модели построения рельефа, центральная часть зачатка крупного бугорка может быть спроецирована на плоскость как круг, а его выступы, – как круги меньшего диаметра (рис. 3, 1). Это состояние будет соответствовать описанному выше варианту схемы (рис. 1, B4), однако количество периферических бугорков в рассмотренном нами случае увеличено до восьми. При проецировании на плоскость иррегулярным бугоркам, окружающим центральный, будут соответствовать круги приблизительно равного диаметра (рис. 3, 2–3). Тогда, согласно циркулярной модели, соприкосновение кругов (взаимное точечное пересечение) приведет к закладке ретикулярной (сетчатой) структуры, в данном случае, образованию соединения (мостика) между соседними кругами.

Таким образом, звездообразный бугорок может рассматриваться как *фрагмент* регулярной структуры с узловыми элементами одинакового размера (рис. 1, B3, Г4) или размера, близкого к одинаковому (рис. 1, B4). При увеличении расстояния между бугорками мостики прерываются, формируя боковые выступы бугорков. При дальнейшем увеличении расстояния между узловыми элементами с сохранением их диаметра форма бугорков будет приближаться к округлой [5: fig. 25J], что соответствует описанному выше состоянию циркулярной модели (рис. 1, B2).

Таким образом, применение циркулярной модели и разработанных на ее основе элементов (модулей) плоскостной организации панциря

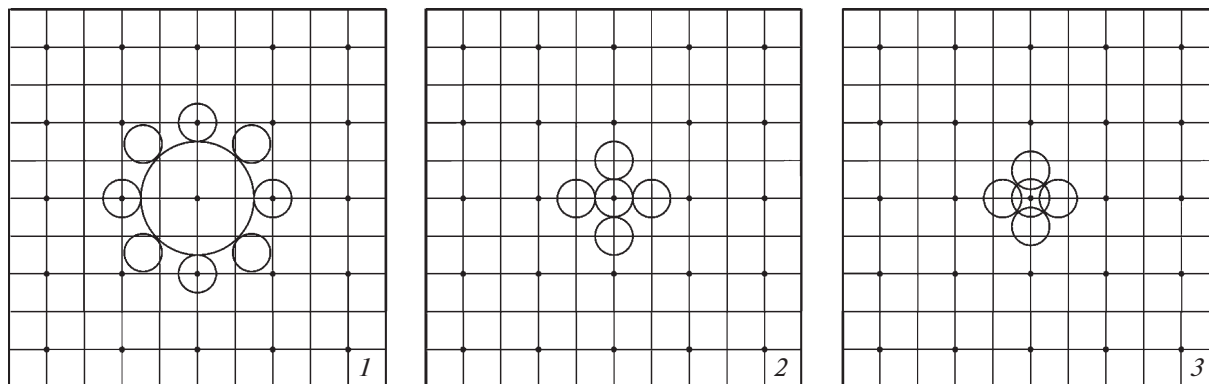


Рис. 3. Элементы плоскостной организации рельефа экзоскелета *Oeselaspis pustulata*, соответствующие: (1) крупному центральному бугорку; (2–3) иррегулярным бугоркам, окружающим центральный.

позволяет анализировать и описывать конкретные типы сложного поверхностного рельефа экзоскелета позвоночных на примере твердых покровов палеозойских костнопанцирных бесчелюстных. Конструирование панцирей в эволюции остеоостраков происходило с соблюдением базовых закономерностей построения экзоскелета позвоночных, проявляющихся в морфогенезе их наружного скелета. Анализ полученной информации позволяет предположить, что симметрия модулей, а также регулярность их расположения, отражают упорядоченность физиологических процессов биоминерализации интегумента в ходе формирования поверхности рельефа панциря у позвоночных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stensiö E. 1932. The cephalaspids of Great Britain. British Museum (Natural History), London.
2. Denison R.H. // Fieldiana: Geol. 1951. V. 11. P. 197–218.
3. Обручев Д.В. // Основы палеонтологии. Т. Бесчелюстные, рыбы. М.: Наука, 1964. С. 84–107.
4. Janvier P. // Annales de Paléontologie. 1985. V. 71. № 2. P. 83–147.
5. Märss T., Afanassieva O., Blom H. // Earth and Environmental Science Trans. Roy. Soc. Edinburgh. 2014. V. 105. P. 73–148.
6. Афанасьева О.Б. // ДАН РАН. 2019. Т. 489. № 1. С. 99–102.
7. Robertson G.M. // Amer. J. Sci. 1935. V. 5. № 29. P. 453–461.
8. Afanassieva O.B. // Paleont. J. 2000. V. 34. Suppl. 2. P. S138–S146.
9. Qu Q., Blom H., Sanchez S., Alberg P. // J. Morph. 2015. V. 276. № 8. P. 1–15.
10. Øravig T. // Ark. Zool. 1951. V. 2. P. 321–454.

ON THE GEOMETRIC REGULARITIES OF THE FORMATION OF THE EXOSKELETAL RELIEF OF EARLY VERTEBRATES (OSTEOSTRACI, AGNATHA) ON A PLANE

O. B. Afanassieva^{a, #}

^a Borissiak Paleontological Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: oafan@paleo.ru

Presented by Academician of the RAS A.V. Lopatin

The study of the diversity of sculpture and histological structure of the exoskeleton in various osteostracan taxa (Osteostraci, Agnatha) made it possible for the first time to characterize the main elements (geometric modules) of the planar organization of a complicated relief on the armor surface of this group of early vertebrates. The analysis was carried out using a circular model for constructing the relief of hard cover, an applicability of the model is shown on the example of a unique material, viz., – fragments of the shield of the osteostracan *Oeselaspis pustulata* (Patten, 1931) from the Silurian deposits of the Severnaya Zemlya archipelago (Russia).

Keywords: early vertebrates, agnathans, Paleozoic, exoskeleton, morphogenesis, geometry of relief

УДК 633.11:632.938

РЕВИЗИЯ ТЕОРИИ ФЛОРА – “ГЕН-НА-ГЕН” – ДЛЯ ФЕНОМЕНОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОРОСТКОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ РЖАВЧИН

© 2021 г. М. А. Колесова¹, А. А. Зуева², Л. Г. Тырышкин^{1,2,*}

Представлено академиком РАН В.А. Драгавцевым

Поступило 14.09.2020 г.

После доработки 18.09.2020 г.

Принято к публикации 18.09.2020 г.

Монопустульными изолятами возбудителей ржавчин пшеницы, овса и ячменя, размноженными в различных условиях среды, заразили экспериментальные образцы этих культур. Различия в типах реакции на заражение одного генотипа растения одним генотипом патогена, размноженным при разных температурах, а также в присутствии хлористого калия, аммиачной селитры и гидразида малеиновой кислоты, указывают на невозможность объяснения феноменов взаимодействия растение-патоген в рамках классической теории Флора “ген-на-ген”. Каждому гену устойчивости хозяина соответствуют несколько комплементарных ему генов вирулентности, либо несколько различных аллелей одного гена вирулентности.

Ключевые слова: зерновые культуры, возбудители ржавчин, взаимодействие, ген-на-ген

DOI: 10.31857/S2686738921010121

“Flor’s enunciation of his gene-for-gene hypothesis was one of the really important events in the history of plant pathology” (Разработка Флором гипотезы “ген-на-ген” было одним из действительно важных событий в фитопатологии).

Van der Plank [1].

Consideration of the gene-for gene relationship that he (Flor) proposed leads to two fundamental rules which parallel the basic rules of genetics formulated by Mendel in the 19th century (Обсуждение предложенного Флором взаимодействия “ген-на-ген” привело к 2 фундаментальным законам, аналогичным основным законам генетики, предложенным Менделем в 19 веке).

McIntosh et al. [2].

Теория Г. Флора “ген-на-ген” (1956 г.) является фундаментальным представлением о генетиче-

ских основах взаимодействия растений с вредными организмами в случае расоспецифической устойчивости. Согласно классическому варианту этой теории выдвинуты три Положения: 1) для каждого гена устойчивости растения у патогена существует только один строго ему комплементарный ген вирулентности; 2) если в системе взаимодействия генотип растения – генотип патогена хотя бы одному аллелю устойчивости противостоит комплементарный аллель авирулентности, то фенотипически наблюдается устойчивость хозяина (авирулентность патогена); 3) если каждому аллелю устойчивости противостоит комплементарный аллель вирулентности, наблюдается восприимчивость растения (вирулентность паразита) [3, 4]. Данное представление доказано для многих систем взаимодействия путем параллельного изучения наследования устойчивости растений к изолятам возбудителей и вирулентности генотипов грибов к растениям-хозяевам, в том числе и для систем взаимодействия злаки – возбудители ржавчинных болезней [5–7]. Отметим, что иногда в системе взаимодействия пшеницы с возбудителями ржавчин наблюдали случаи несовпадения числа генов, контролирующей устойчивость хозяина и вирулентность патогена [8–10], что, однако, могло быть связано с тесным сцеплением нескольких генов устойчивости (по результатам гибридологического анализа посту-

¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

² Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства имени Н.М. Тулайкова – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Самарского федерального исследовательского центра Российской академии наук Самарская обл., Безенчук, Россия

*e-mail: tyryshkinlev@rambler.ru

Таблица 1. Типы реакции изогенных линий пшеницы с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr* (leaf rust) на заражение клонами *P. tritricina* при их размножении в разных условиях

Клон размножен на	<i>Lr</i> ген				
	1	2a	20	23	26
Клон 1					
Вода	3	3	3	3	3
Хлористый калий/KCl	3	3	3	3	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	3	0	0	0
ГМК	3	3	3	3	3
Вода, 28°C	3	0	3	3	3
Клон 2					
Вода	3	3	3	0	3
Хлористый калий/KCl	3	3	3	0	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	3	0	3	0	3
ГМК	3	3	3	3	3
Вода, 28°C	0	3	0	0	0
Клон 3					
Вода	0	0	0	3	0
Хлористый калий/KCl	3	0	3	3	0
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	0	3	0
ГМК	0	3	0	3	0
Вода, 28°C	0	0	0	0	0
Клон 4					
Вода	0	0	0	0	0
Хлористый калий/KCl	0	3	0	3	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	0
ГМК	3	0	3	0	0
Вода, 28°C	0	0	0	0	0

лируется наличие одного гена, а фактически их несколько).

В нашей работе при изучении системы пшеница – изоляты *Puccinia tritricina* Erics. показано, что данные по взаимодействию взрослых растений с патогеном не могут быть объяснены классическим взаимоотношением ген-на-ген [11]. В настоящей работе мы представляем экспериментальные данные, доказывающие, что классическая теория Флора не может объяснить во многих случаях и взаимодействие проростков зерновых культур с возбудителями ржавчин и предлагаем ее уточненный вариант.

Монопустульные изоляты (клоны, генотипы) возбудителей листовой ржавчины пшеницы *P. tritricina*, карликовой ржавчины ячменя *P. hordei* Otth и корончатой ржавчины овса *P. coronata* Corda размножали на отрезках листьев восприимчивых

сортов, помещенных на вату, смоченную водой при 22°C и 28°C, а также помещенных на вату, смоченную растворами хлористого калия (0.48 г/л), аммиачной селитры (1.29 г/л) и гидразида малеиновой кислоты (ГМК, maleic acid hydrazide МАН) (10 мг/л) при 22°C [12]. Клонами *P. tritricina* инокулировали растения 5 линий пшеницы, клонами *P. hordei* – растения 5 сортов ячменя, клонами *P. coronata* – растения 5 сортов овса. Растения до и после заражения выращивали при 22°C и постоянном освещении – 2500 люкс. Типы реакции на заражение учитывали через 8 сут после инокуляции по шкале [13], где 0 (отсутствие симптомов заражения) – устойчивость хозяина, авирулентность патогена, 3 (крупные пустулы без некрозов) – восприимчивость растения, вирулентность изолята патогена.

Результаты экспериментов для 4 клонов каждого патогена приведены в табл. 1–3.

Полученные данные однозначно указывают на невозможность объяснения взаимодействия растение-патоген в рамках классической теории Флора “ген-на-ген”.

Аргументацию данного утверждения приводим для системы взаимодействия пшеница – возбудитель листовой ржавчины; для двух других систем она будет абсолютно аналогичной. Далее рассмотрим противоречия наших экспериментальных данных каждому из трех Положений (2, 3 и 1) теории Флора.

Положение 2. Если в системе взаимодействия хотя бы одному аллелю устойчивости противостоит комплементарный аллель авирулентности, то наблюдается устойчивость хозяина (авирулентность патогена). Фактические данные противоречат данному утверждению. В системе взаимодействия пшеница – *P. tritricina* клон 2 был авирулентен на линии с геном *Lr23*, клон 3 – на линии с геном *Lr2a* и клон 4 – на линиях с генами *Lr1* и *Lr20* при размножении их на отрезках листьев в воде. Согласно теории Флора эти клоны имеют аллели авирулентности, соответствующие данным генам устойчивости. Однако эти генотипы гриба проявили реакцию вирулентности после их размножения в присутствии ГМК (см. табл. 1), т.е. они должны иметь аллели вирулентности, комплементарные данным генам устойчивости.

Авирулентные при размножении на воде клоны 3 на линии с геном *Lr20* и 4 – на линиях с генами *Lr2a*, *23*, *26* после их размножения в присутствии хлористого калия были вирулентны к этим линиям, что указывает на наличие у них в первом эксперименте аллелей авирулентности, а во втором – аллелей вирулентности. Эти очевидные противоречия могут теоретически быть объяснены влиянием ГМК и соли калия на изменение экспрессии конкретных аллелей авирулентности,

чему явно противоречит отсутствие таких изменений у других клонов патогена.

Положение 3. Если каждому аллелю устойчивости противостоит комплементарный аллель вирулентности, наблюдается восприимчивость растения (вирулентность паразита).

Полученные данные противоречат и этому утверждению. Клон 1 *P. triticina*, размноженный на воде при 22°C, вирулентен к линиям с генами *Lr1*, 20, 23, 26 (см. табл. 1) и, соответственно, согласно классической теории “ген-на-ген” имеет аллели вирулентности, комплементарные данным генам устойчивости; клон 2 вирулентен на линии с геном *Lr2a* и согласно теории Флора имеет комплементарный аллель вирулентности. Эти клоны, размноженные в присутствии соли азота, были авирулентны к данным линиям, следовательно, согласно теории Флора должны иметь соответствующие аллели авирулентности.

Аналогично, после размножения при 22°C клон 1 был вирулентен на линии с геном *Lr2a*, клон 2 – на линиях с генами *Lr1*, 20 и 26, клон 3 – на линии с геном *Lr23*, т.е. они имеют аллели вирулентности к данным генам устойчивости. При их размножении при повышенной температуре они были авирулентны на данных линиях и, следовательно, имеют аллели авирулентности. Данное противоречие можно было бы объяснить влиянием соли азота и повышенной температуры на экспрессию этих аллелей вирулентности по типу модификационной изменчивости, и они начинают функционировать как аллели авирулентности. Этому, однако, очевидно противоречит отсутствие таких изменений для других комбинаций взаимодействия линия-клон патогена (например, линии с геном *Lr1* и клоном 2 при его размножении в присутствии аммиачной селитры, линии с геном *Lr1* и клоном 1 при его размножении при высокой температуре).

Положение 1. Для каждого гена устойчивости растения-хозяина у патогена существует только один строго ему комплементарный ген вирулентности. Полученные экспериментальные результаты противоречат и данному положению. Так, под действием аммиачной селитры у некоторых генотипов патогенов изменяется экспрессия гена (ов), комплементарных генам резистентности, но не зависимых от гена, обуславливающего вирулентность в отсутствие этого вещества. При размножении клонов при повышенной температуре также изменяется экспрессия дополнительных генов вирулентности, комплементарных генам устойчивости, и не связанных с генами, детерминирующими вирулентность в “нормальных” условиях. Таким образом, только для одного гена устойчивости патоген должен иметь не менее 3 (вероятно больше) комплементарных ему аллелей авирулентности, экспрессирующихся в раз-

Таблица 2. Типы реакций растений овса на заражение монопустульными изолятами возбудителя корончатой ржавчины после их размножения в разных условиях среды

Клон размножен на	Сорт				
	Иртыш	Талисман	Эффектив	Гаврош	Озон
Клон 1					
Вода	0	3	0	3	3
Хлористый калий/KCl	3	3	0	3	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	3	0	0	3
ГМК	0	3	3	3	3
Вода, 28°C	0	0	0	3	0
Клон 2					
Вода	0	3	3	3	0
Хлористый калий/KCl	0	3	3	3	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	3	3	0
ГМК	3	3	3	3	0
Вода, 28°C	0	3	0	0	0
Клон 3					
Вода	3	0	0	0	3
Хлористый калий/KCl	3	3	3	0	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	0
ГМК	3	0	0	3	3
Вода, 28°C	0	0	0	0	3
Клон 4					
Вода	3	0	3	0	0
Хлористый калий/KCl	3	3	3	3	0
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	3	0	0	0	0
ГМК	3	0	3	0	3
Вода, 28°C	3	0	3	0	0

личных условиях. Также клон-специфичное изменение авирулентности генотипов патогенов в сторону вирулентности к конкретному гену резистентности хозяина под действием ГМК и соли калия указывает на наличие не менее 3 аллелей вирулентности, комплементарных конкретному гену устойчивости растения. Таким образом, одному гену устойчивости хозяина комплементарны несколько генов вирулентности возбудителей ржавчин зерновых культур, дифференциальная экспрессия которых наблюдается при изменении условий размножения генотипов возбудителей. Альтернативным объяснением может быть наличие у патогенов одного гена вирулентности, комплементарного одному гену устойчивости хозяи-

Таблица 3. Типы реакций листьев растений ячменя на заражение монопустьевыми изолятами возбудителя карликовой ржавчины после их размножения в разных условиях среды

Клон размножен на	Сорт				
	Эльф	Золотник	Ленинградский	Саша	Олимпик
Клон 1					
Вода	3	0	3	0	3
Хлористый калий/KCl	3	3	3	3	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	3
ГМК	3	0	3	0	3
Вода, 28°C	3	0	3	3	0
Клон 2					
Вода	3	0	0	0	3
Хлористый калий/KCl	3	0	3	0	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	3	0	0	0	0
ГМК	3	3	0	3	3
Вода, 28°C	0	0	0	0	3
Клон 3					
Вода	0	0	0	0	3
Хлористый калий/KCl	3	3	0	3	3
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	0
ГМК	0	0	3	0	3
Вода, 28°C	0	0	0	0	3
Клон 4					
Вода	0	0	3	0	0
Хлористый калий/KCl	0	3	3	0	0
Аммиачная селитра/NH ₄ NO ₃	0	0	3	0	0
ГМК	3	0	3	3	3
Вода, 28°C	0	0	0	0	0

на, но имеющего несколько (очевидно более 5) аллелей вирулентности и авирулентности, каждый из которых специфически изменяет экспрессию под действием абиотических факторов внешней среды.

Таким образом, по результатам проведенной работы взаимодействие хозяин-патоген в варьирующих условиях развития возбудителей ржавчин зерновых культур не может быть описано в рамках классической теории Флора “ген-на-ген”. В уточненном виде данные взаимоотношения могут быть описаны как “ген-на-гены” либо “аллель-на-аллели”. Предлагаемая ревизия теории “ген-на-ген” расширяет представления о генетических основах взаимодействия хозяин-патоген и

теоретически может привести к ряду практических следствий в изучении устойчивости зерновых культур, популяционных исследований фитопатогенов и защиты растений.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Финансирование исследования за счет государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме № 0662-2019-0006 “Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Van der Plank J.E.* Plant Diseases: Epidemics and Control. New York, USA: Academic Press. 1963. <https://doi.org/10.1097/00010694-196410000-00018>
2. *McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F.* Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Press. Melbourne. 1995. <https://doi.org/10.1071/9780643101463>
3. *Flor H.H.* The complementary genetic system in flax and flax rusts // *Advanced Genetics*. 1956. V. 8. P. 29–54. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60498-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60498-8)
4. *Flor H.H.* Current status of the gene-for-gene concept // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1971. V. 9. P. 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
5. *Martens J.W., McKenzie R.H., Green G.W.* Gene-for-gene relationships in the *Avena: Puccinia graminis* host-parasite system in Canada // *Can. J. Bot.* 1970. V. 48. P. 969–975.
6. *Samborski D.J., Dyck P.L.* Inheritance of virulence in wheat leaf rust on the standard differential wheat varieties // *Can. J. Genet. Cytol.* 1968. V. 10. P. 24–32.
7. *Samborski D.J., Dyck P.L.* Inheritance of virulence in *Puccinia recondita* on six backcross lines with single genes for resistance to leaf rust // *Can. J. Bot.* 1976. V. 54. P. 1666–1671.
8. *Statler G.D.* Inheritance of virulence of culture 73-47 *Puccinia recondita* // *Phytopathology*. 1977. V. 67. P. 906–908. <https://doi.org/10.1094/Phyto-67-906>
9. *Statler G.D.* Inheritance of virulence of *Puccinia triticina* culture X47, the F1 of the cross 71-112 x 70-1 // *Can. J. Plant Pathol.* 2000. V. 22. P. 276–279. <https://doi.org/10.1080/07060660009500475>
10. *Wang L., Zheng D., Zuo S., et al.* Inheritance and linkage of virulence genes in Chinese predominant race CYR32 of the wheat stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp.

- tritici* // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00120>
11. Тырышкин Л.Г., Захаров В.Г., Сюков В.В., Шевченко С.Н. Генетическое взаимодействие взрослых растений пшеницы и возбудителя листовой ржавчины: “ген-на-ген” или “ген-на-гены”? // Известия Самарского НЦ РАН. 2014. Т. 16. № 5 (3). С. 1177–1180.
12. Тырышкин Л.Г. Модификационная изменчивость вирулентности и агрессивности фитопатогенов зерновых культур: выводы, следствия, возможности практического применения: монография. СПб., 2016.
13. Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss // Phytopathology. 1926. V. 16. № 1. P. 89.

REVISION OF THE “GENE-FOR-GENE” FLOR’S THEORY FOR THE PHENOMENONS OF INTERACTION OF SEREALS SEEDLINGS WITH RUST PATHOGENS

M. A. Kolesova^a, A. A. Zueva^b, and L. G. Tyryshkin^{a,b,#}

^a N.I. Vavilov All-Russian Institute of plant genetic resources St. Petersburg, Russian Federation

^b Samara Scientific Research Agriculture Institute named after N.M. Tulaykov – Branch of the Federal State Budgetary Institution of Science Samara Federal Research Scientific Center of Russian Academy of Sciences Samara region, Besenchuk, Russian Federation

[#]e-mail: tyryshkinlev@rambler.ru

Presented by academician of the RAS V.A. Dragavtsev

Monopustule isolates of wheat, oats and barley rust pathogens reproduced under different environmental conditions were used to infect experimental samples of these crops. Differences in the types of reactions after infection of one plant genotype with one pathogen genotype multiplied at different temperatures, as well as in the presence of potassium chloride, ammonium nitrate and maleic acid hydrazide indicate the impossibility of explaining the phenomena of plant – pathogen interaction within the framework of the classical Flor’s theory “gene-for-gene”. Each gene of the host resistance corresponds to several complementary virulence genes, or to several different alleles of one same gene for virulence.

Keywords: cereals, rust pathogens, interaction, gene-for-gene

УДК 591.4+592

СТРОЕНИЕ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ПЛЕРОЦЕРКОИДА *PYRAMICOCEPHALUS PHOCARUM* (CESTODA: DIPHYLLOBOTHRIDEA): ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СУЩЕСТВОВАНИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНЫХ ТЕРМИНАЛЬНЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. Н. М. Бисерова^{1,*}, А. Р. Мустафина¹, академик РАН В. В. Малахов¹

Поступило 25.08.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принято к публикации 25.09.2020 г.

Выделительная система плероцеркоида *Pyramicocephalus phocarum* исследована на ультраструктурном уровне и с применением цитохимических методов. Показано, что у *P. phocarum* имеются самостоятельные терминальные клетки – циртоциты. Вся канальная система представляет собой единый синцитий, частью которого являются воронка терминального канальца, периферические и центральные каналы. Нефридиальная воронка и циртоцит образуют фильтрационный комплекс протонефридиального типа. В каудальном отделе несколько периферических каналов открываются в глубокую складку тегумента – мочевой пузырь. Экскреторные поры отделены от тегумента кольцевыми септированными десмосомами. Внутри экскреторной системы клеточные контакты отсутствуют. Иммуноцитохимически в циртоцитах установлено наличие F-актинового кольца и экспрессия несинаптического серотонина в зоне воротничка.

Ключевые слова: цестоды, протонефридий, циртоцит, ресничные клетки, синцитий, клеточные контакты, несинаптический серотонин

DOI: 10.31857/S2686738921010066

Цестоды – глубоко специализированная группа паразитических плоских червей, в состав которой входят возбудители опасных заболеваний человека и животных. Гистологическая организация цестод сильно модифицирована; основные ткани имеют синцитиальное строение [1–3]. Выделительная система цестод представлена протонефридиями, но в связи с большими размерами тела взрослых червей она сильно усложнена: значительная ее часть представлена синцитием [4–6]. Одним из наиболее интересных вопросов морфологии цестод на данный момент остается вопрос о том, имеются ли у цестод самостоятельные терминальные клетки (циртоциты), характерные для других плоских червей. По одним данным, у цестод нет отдельных циртоцитов [7, 6], и вся выделительная система представляет собой синцитий, а по другим – проксимальные части канальцев выделительной системы заканчиваются самостоятельными терминальными клетками [5, 8, 9]. Хауэлл [8] указывает на наличие пор между циртоцитом и нефридиальной воронкой и отвергает идею суще-

ствования у цестод протонефридиев. Для выяснения этого и других вопросов мы предприняли собственные исследования выделительной системы плероцеркоидов *Pyramicocephalus phocarum* (Fabricius, 1780) Monticelli, 1890 (Diphyllbothriidea: Diphyllbothriidae).

Плероцеркоиды *P. phocarum* получены из трески в Кандалакшском заливе Белого моря, зафиксированы для ультраструктурных и иммуноцитохимических исследований по методикам, разработанным для цестод [10]. Ультратонкие срезы получали на микротоме Leica EM UC7, просматривали под трансмиссионным электронным микроскопом JEM-1011. Замороженные срезы (5 мкм) окрашивали антителами к серотонину (5-HT) и α -тубулину (α -TUB) и фаллоидином с флуоресцентной меткой. Препараты исследовали на конфокальном микроскопе Nikon.

Экскреторная система *P. phocarum* представлена системой каналов разного диаметра, открывающихся наружу порой на заднем конце тела, и циртоцитами, замыкающими терминальные каналы в паренхиме (рис. 1а). В субтегументе и кортикальной паренхиме имеется развитая сеть периферических каналов. В сколексе и передней части тела имеется два центральных продольных канала, которые на заднем конце дихотомически

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: nbiserova@yandex.ru

ветвятся. На заднем конце тела канальная система плероцеркоида открывается *многочисленными порами в мочевой пузырь*, имеющий форму вытянутой трубки со складчатой поверхностью. Стенки мочевого пузыря образованы впячиванием тегумента. В месте соединения эпителия впадающих каналов и тегумента мочевого пузыря нами обнаружены *кольцевые септированные десмосомы*. У разных видов цестод на более ранней стадии развития – процеркоид, описаны парные экскреторные поры, расположенные перед церкомером [11, 12].

Процеркоиды цестод – паразиты беспозвоночных, и обитают в гемоцеле первого промежуточного хозяина, преимущественно ракообразных [1, 6, 7, 11, 12]. Следующая стадия, плероцеркоиды – паразиты позвоночных, обитают как в тканях, так и в полости тела хозяина. Причины формирования общего мочевого пузыря с одним отверстием у плероцеркоидов цестод, включая *P. phocarum*, не до конца понятны и требуют дальнейших исследований.

Циртоциты *P. phocarum* расположены в зоне субтегумента и кортикальной паренхимы (200 клеток/мм²). Клетки лежат ядром к тегументу, а ресничками к центру тела; изредка встречаются парные циртоциты. В циртоцитах впервые обнаружена IR к *серотонину* (5-НТ), которая охватывает приядерную зону с кинетосомами и корешками ресничек, и участок верши. Экспрессия 5-НТ циртоцитами выявлена впервые и свидетельствует об участии серотонина в моторике ресничного пламени. Кроме того, в перикарионе выявлен F-актин, кольцом охватывающий зону ресничного пучка в его основании (рис. 16).

В циртоцитах насчитывается до 100 ресничек длиной до 9 μm ; их корешки частично прилегают к ядерной мембране и образованы электронноплотными тяжами без регулярной исчерченности. Пучок ресничек окружен *воротничком* микроворсинок диаметром 150 нм в виде трубки и тонкими нерегулярными лептотрихиями. Пучок ресничек входит внутрь *воронки терминального канальца*, которая имеет иное строение, чем эпителий в других отделах выделительной системы. Край воронки образован венчиком длинных пальцевидных выростов, средняя расширенная часть – плотной цитоплазмой, содержащей филаменты; узкая часть воронки имеет стенки с микроворсинками и продолжается в узкий разветвленный канал. Нефридиальная воронка и циртоцит образуют *фильтрационный комплекс* протонефридиального типа, представленный двумя рядами пальцевидных микроворсинок (рис. 1в, г). Их наружная мембрана несет слой экстраклеточных филаментов (толщина слоя 22 нм), которые организованы в регулярные скопления, чередующиеся по принципу zip-соединения на двух разно-

именных мембранах. Участие актина в zip-соединении подтверждается цитохимически. Наличие открытых пор (нефростома) без zip-соединения филаментов нами не установлено.

Ультраструктура стенок каналов характеризуется отсутствием *межклеточных контактов* и имеет *синцитиальное строение с разной степенью погруженности ядер*. Терминальные канальцы проходят вблизи ядра, ядра цитонов *периферических каналов* также часто лежат вблизи просвета. Ядра *центральных каналов* погружены под слой мускулатуры и имеют длинные цитоплазматические мостики, связывающие их с апикальной цитоплазмой. Перикарионы образуют *базальные отростки* разного диаметра, формирующие *протяженные щелевые контакты с клетками паренхимы*. Стенки центральных каналов иннервируются нейронами главных нервных стволов, выявленных при окраске на α -тубулин, что доказывает участие нервной системы в их перистальтике.

Таким образом, вся канальная система *P. phocarum* представляет собой *единый синцитий*, включающий *воронки терминальных канальцев, периферические и центральные продольные каналы*. Клеточные контакты в экскреторном синцитии *P. phocarum* не обнаружены. Наши результаты подтверждают отсутствие десмосом в канальной части системы как аутопоморфию цестод [13]. В отличие от *P. phocarum*, у взрослых циклофиллид *Rauschiaenia ancora* (Mamaev, 1959) Bondarenko, Tomilovskaja, 1979 и *Diorchis stefanskii* Czaplinski, 1956 в стенках каналов отмечены контакты типа септированных десмосом [9]. Отличия имеются и в строении циртоцитов циклофиллид, для которых описаны исчерченные корешки ресничек и наличие септированных десмосом на концах микроворсинок терминальной воронки и циртоцита [9].

Наличие самостоятельных циртоцитов у плероцеркоида *P. phocarum* противоречит результатам исследований псевдофиллидных цестод [6], к которым ранее относили дифиллоботриид, и поддерживает выводы разных авторов для неоцермат в целом [5, 8, 13]. Самостоятельность циртоцитов косвенно подтверждается выявлением серотонина и актина только в терминальной клетке и их отсутствием в стенке канальца. Актин играет важную роль в межклеточной адгезии; серотонин является универсальным сигнальным веществом беспозвоночных, контролирующим разнообразные процессы, в том числе ресничную моторику. Ранее в циртоцитах плероцеркоидов близкого вида дифиллоботриид был обнаружен простагландин E₂ [14, 15], возможный иммуномодулятор и вазодилатор, что в сочетании с серотонином и актином указывает на активную роль терминальных клеток в циркуляции сигнальных молекул и метаболитов в теле паразитов.

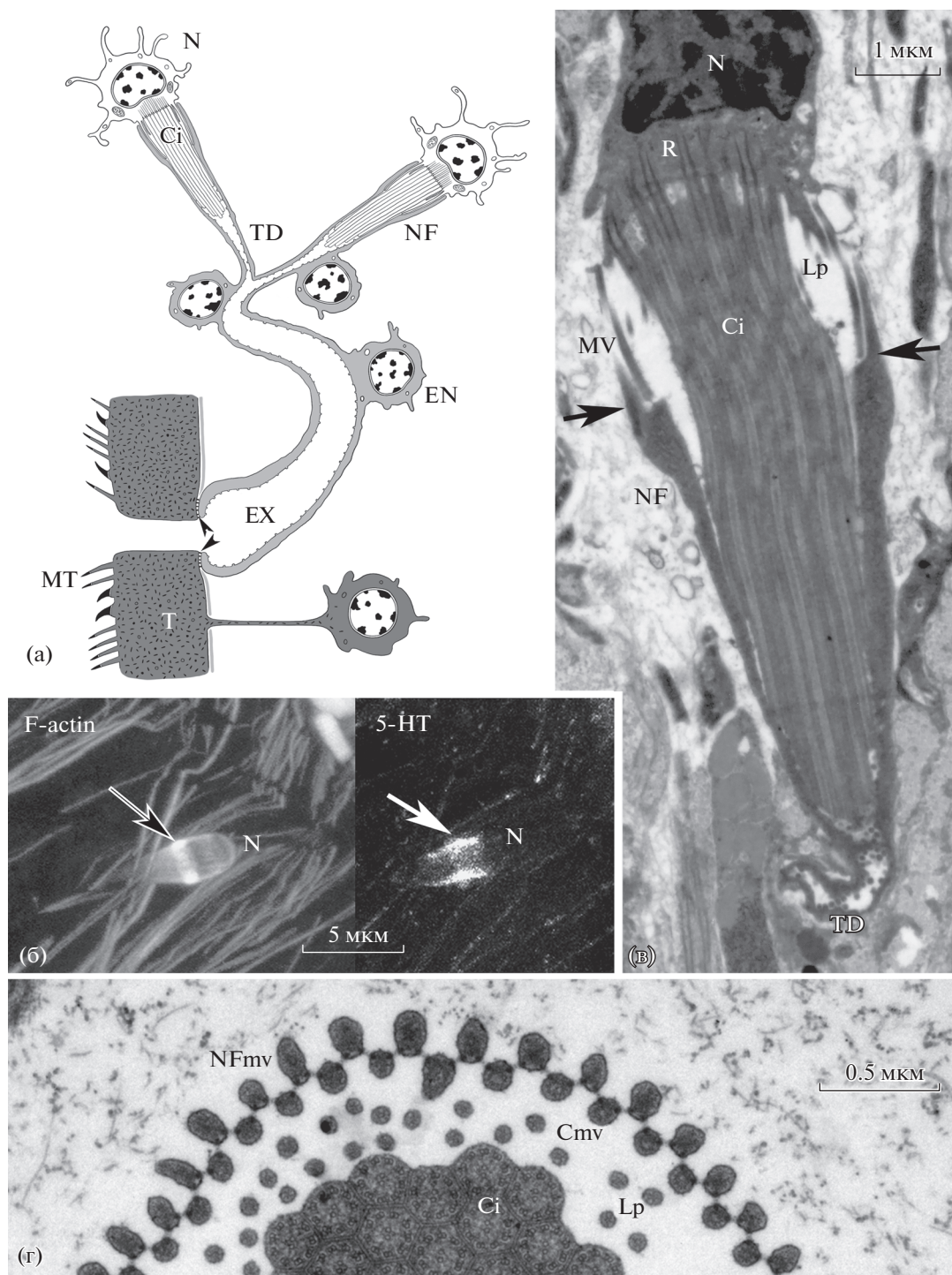


Рис. 1. Выделительная система *P. phocarium*. (а) – схема, межклеточные контакты обозначены короткими стрелками; (б) – иммуномечение F-актина и серотонина (5-НТ) в циртоцитах (стрелки); (в) – продольный срез циртоцита и нефридиальной воронки (стрелки); (г) – поперечный срез фильтрационного комплекса. (Ci – реснички, Cmv – микроворсинки циртоцита; EN – ядро цитона экскреторного синцития, EX – экскреторный канал, Lp – лептотрихии, MT – микротрихии, MV – микроворсинки, N – ядро циртоцита, NF – воронка канала, NFmv – микроворсинки нефридиальной воронки, R – корешки, T – тегумент, TD – терминальный каналец).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории электронной микроскопии и межфакультетскому центру конфокальной микроскопии Биологического факультета МГУ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-34-90047.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Coil W.* Platyhelminthes: Cestoidea // *Microscopic anatomy of Invertebrates*. 1991. V. 3. P. 211–283.
2. *Корнева Ж.В.* Тканевая пластичность и морфогенезы у цестод. М.: Наука; 2007.
3. *Korneva Zh. V.* Characterization of Cestoda Tissue Organization // *Biology Bulletin*. 2013. V. 40. P. 146–157.
4. *Lumsden R., Hildreth M.* The Fine Structure of Adult Tapeworms // *Biology of the Eucestoda*. 1983. V. 1. P. 177–233.
5. *Wilson R.A., Webster L.* Protonephridia // *Biological Reviews*. 1974. V. 49. P. 127–160.
6. *Куперман Б.И.* Функциональная морфология низших цестод. Наука; 1988.
7. *Rohde K.* Ultrastructural studies of *Austramphilina elongate* (Cestoda, Amphilinidea) // *Zoomorphology*. 1986. V. 106. P. 91–102.
8. *Howells R.E.* Observations on the nephridial system of the cestode *Moniezia expansa* (Rud., 1805) // *Parasitology*. 1969. V. 59. P. 449–459.
9. *Поспехова Н.А., Краснощеков Г.П., Поспехов В.В.* Протонефридиальная система сколекса циклофиллией // *Паразитология*. 1993. Т. 27. С. 48–53.
10. *Бисерова Н.М.* Методы визуализации биологических ультраструктур. Подготовка биологических объектов для изучения с помощью электронных и конфокальных лазерных микроскопов. Практическое руководство для биологов. М. Изд. КМК. 2013.
11. *Korneva J.V.* Fine structure and development of *Tri-aenophorus nodulosus* (Cestoda) during metamorphosis: a review // *Acta Zoologica*. 2004. V. 85. P. 59–68.
12. *Malmberg G.* On the early development of the protonephridial systems in some species belonging to the genera *Diphyllobothrium*, *Tri-aenophorus* and *Schistocephalus* (Cestoda, Pseudophyllidea) // *Zoologica Scripta*. 1972. V. 1. № 4. P. 227–228.
13. *Xylander W.* The Gyrocotylidea, Amphilinidea and the early evolution of Cestoda // *Interrelationships of the Platyhelminthes*. 2001. P. 103–111.
14. *Biserova N.M., Kutyrev I.A., Malakhov V.V.* Tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda) produces prostaglandin E₂, a regulator of host immunity // *Doklady Biological Sciences*. 2011. V. 441. P. 363–365.
15. *Kutyrev I.A., Biserova N.M., Olennikov D.N., et al.* Prostaglandins E₂ and D₂ – regulators of host immunity in model parasite *Diphyllobothrium dendriticum*: immunocytochemical and biochemical study // *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2017. V. 212. P. 33–45.

STRUCTURE OF THE EXCRETORY SYSTEM OF PLEROCERCIDS PYRAMICOCEPHALUS PHOCARUM (CESTODA: DIPHYLLOBOTHRIIDEA): PROOF FOR THE EXISTENCE OF AN INDEPENDENT TERMINAL CELLS

N. M. Biserova^{a,#}, A. R. Mustafina^a, and academician of the RAS V. V. Malakhov^a

^a *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

The excretory system ultrastructure and immunocytochemistry was investigated in the plerocercoid *Pyramicocephalus phocarum*. It was shown that *P. phocarum* has independent terminal cells – cyrtocytes. The entire canal system is a single undivided syncytium, which includes nephridial funnels, terminal tubules, peripheral and central canals. The nephridial funnel and cyrtocyte form a filtration complex of the protonephridial type. In the caudal region, several peripheral canals open into a deep fold of the tegument – the urinary bladder. The excretory pores are separated from the tegument by annular septate desmosomes. There are no cell junctions inside the excretory system. The presence of the F-actin ring and the expression of non-synaptic serotonin in the collar area were detected in cyrtocytes using methods of immunocytochemistry.

Keywords: cestoda, excretory system, cyrtocyte, protonephridium, syncytium, cell junctions, non-synaptic serotonin

УДК 595.132

КОНЦЕНТРИЧЕСКИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ В КИШЕЧНОМ ЭПИТЕЛИИ ЭХИУРИДЫ *BONELLIA VIRIDIS*: СТРОЕНИЕ И ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИЯ

© 2021 г. П. А. Кузнецов¹, Е. Н. Темерева^{1,*}

Представлено академиком РАН В. В. Малаховым

Поступило 23.09.2020 г.

После доработки 29.09.2020 г.

Принято к публикации 30.09.2020 г.

Изучение анатомии и тонкого строения эхиурид имеет большое значение для понимания биологии этих животных, ведущих скрытый образ жизни и доминирующих в различных бентосных сообществах. Методами сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии были получены первые данные об организации сифонального отдела средней кишки самок *Bonellia viridis*. Впервые в клетках средней кишки обнаружены необычные концентрические включения, сходные по ультраструктуре с включениями, описанными у других животных, например, в кишечнике многих видов нематод и в тегументе некоторых цестод. Для этих животных известно, что концентрические включения играют важную роль в связывании химических агентов, присущих окислительно-восстановительным средам. Интересно, что исследованные особи *B. viridis* были обнаружены на поверхности субстрата, лишенного признаков окислительно-восстановительной среды. Новые результаты свидетельствуют о наличии у *B. viridis* и, возможно, у всех эхиурид, преадаптаций к жизни в окислительно-восстановительных средах. Новые данные о строении и составе концентрических включений прольют свет на их происхождение и функции.

Ключевые слова: Echiura, Annelida, морфология, кишечник, включения

DOI: 10.31857/S2686738921010157

Эхиуриды – это небольшая группа несеgmentированных морских бентосных червей, которая насчитывает около 165–195 видов [1]. Согласно современным данным молекулярной филогенетики эхиуриды представляют собой одну из групп кольчатых червей (Annelida). Эхиуриды живут скрытно, их тело целиком скрыто в норе, из которой они высовывают только хобот. Такие особенности биологии делают эхиурид крайне труднодоступными для изучения, из-за чего многие системы органов эхиурид остаются практически не исследованными современными методами [2]. Это в полной мере касается и организации пищеварительного тракта, который, как оказалось, демонстрирует существенные вариации анатомической организации у разных видов [3]. Детальное изучение тонкого строения средней кишки позволит лучше понять особенности функционирования этого особого отдела кишечника и прольет свет на биологию этих загадочных животных.

Целью настоящей работы было изучение тонкой организации эпителия сифонального отдела средней кишки самок *Bonellia viridis*.

Материалом для работы послужили три самки *B. viridis* Rolando, 1821, собранные на каменистом дне в Марсельском заливе у острова План (Plane) 43° 11' 09.99" N – 5° 23' 29.52" E, на глубине 25–27 м. Животных собирали на поверхности каменистого субстрата в ходе погружений с легководолазным снаряжением. Животных вскрывали, участки средней кишки фиксировали в 2.5% растворе глутарового альдегида на 0.2M фосфатном буфере. Для изучения методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) участки средней кишки дегидратировали в этаноле и ацетоне, высушивали в критической точке, наклеивали на столики и напыляли смесью платины и палладия. Тонкая морфология сифонального отдела средней кишки была изучена в сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA. Для изучения ультратонкой организации кишечного эпителия методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) участки кишечника были отмыты в буфере, постфиксированы в 1% растворе тетроксид осмия, обезвожены и заключены в смолу Embed-812. Подготовленные блоки

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова Москва, Россия

*e-mail: temereva@mail.ru

были ультратомированы на полутонкие и ультратонкие срезы. Полутонкие срезы были окрашены метиленовым синим, изучены в световой микроскоп Zeiss Axioplan 2 и сфотографированы цифровой камерой. Ультратонкие срезы контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца и изучали на микроскопах JEOL JEM-2100 и JEOL JEM-1011.

Сифональный отдел средней кишки самок *B. viridis* характеризуется наличием протяженной коллатеральной трубки – сифона (рис. 1а, 1б). Диаметр сифона не превышает 300 мкм, тогда как диаметр сифонального отдела средней кишки может достигать 4 мм (рис. 1а, 1б). Просвет сифона заполнен тонкими длинными складками эпителия (рис. 1б). Сифональный отдел средней кишки выстлан высоким столбчатым однослойным эпителием, высота клеток которого составляет 60–70 мкм (рис. 1б). Эпителий формирует крупные продольные складки, которые вдаются в просвет кишки. Эпителий сифонального отдела средней кишки не однороден по гистологическому строению. Так, ресничный желобок, проходящий в месте прилегания сифона, образован ресничными клетками, лишенными включений, тогда как клетки остального эпителия сифонального отдела средней кишки несут многочисленные включения (рис. 1б). Как показали ультраструктурные исследования, включения, как правило, занимают апикальную и среднюю части клеток. Каждое включение располагается внутри вакуоли и окружено тонкой мембраной (рис. 1г). Пространство вакуоли между включением и мембраной имеет различный объем, заполнено электронно-светлым материалом и содержит мелкие мембранные пузырьки диаметром около 0.1 мкм (рис. 1г). Мембранных пузырьков может быть довольно много, либо же они могут вовсе отсутствовать. В некоторых включениях в пространстве под мембраной обнаруживаются крупные везикулы, а также небольшие включения и мультивезикулярные тельца. Сами концентрические включения имеют разные размеры: их диаметр колеблется от 1 до 2 мкм. Включения имеют очень характерную правильную концентрическую структуру: в них закономерно чередуются электронно-плотные и электронно-светлые зоны, которые образуют кольца по периметру включения (рис. 1в, г). Число концентрических зон может быть различно: от 2 до 10. Центр включения может быть светлым или же заполнен электронно-плотным содержимым. В некоторых включениях обнаруживаются две ацентрические области (рис. 1г). Как правило, одно концентрическое включение залегает внутри собственного пространства, окруженного мембраной. Однако зачастую можно видеть, что несколько включений формируют крупные скопления, окруженные общей мембраной. При этом индивидуаль-

ная мембрана может сохраняться или отсутствовать (рис. 1в). Диаметр таких скоплений может достигать 3–4 мкм.

Анатомия пищеварительного тракта сходна в пределах группы *Echiura*. За исключением карликовых самцов бонеллид пищеварительная система эхиурид состоит из 3 отделов: передней, средней и задней кишки [2]. Уникальной особенностью строения средней кишки эхиурид является наличие сифона. Его функция до конца непонятна.

Необычной ультраструктурной особенностью клеток средней кишки исследованных нами экземпляров *B. viridis* является наличие в их цитоплазме специфических концентрических включений. В эпителии кишечника эхиуриды *Urechis caupo* были описаны клетки, содержащие сульфид-окисляющие гранулы, такие же, как и в эпителии стенки тела у этого вида [4]. По мнению авторов работы, сульфидокисляющие гранулы участвуют в детоксификации сульфидов, которые накапливаются в норе животного в бескислородных условиях. Микрорентгеновский анализ этих включений показал, что они состоят из алюминия, хлора, железа, меди и фосфора. Эти вещества представлены в разных пропорциях на протяжении всего пищеварительного тракта. Хлор составляет большую долю, и его концентрация наибольшая в гранулах клеток средней кишки. Железо и алюминий занимают второе место по обилию в составе гранул. Наибольшая концентрация обоих этих элементов отмечена в клетках жевательного желудка [4]. Важно отметить, однако, что на электроннограммах, представленных в работах цитированных авторов [4], сульфид-окисляющие гранулы не имеют характерной концентрической структуры.

Ультратонкое строение включений, обнаруженных в средней кишке *B. viridis*, довольно сильно отличается от такового сульфидокисляющих гранул, описанных Меноном и Арпом у *U. caupo* [4], однако имеет настолько характерные черты, что сравнимо с подобными включениями, обнаруженными в кишечнике других беспозвоночных. Специфические концентрические включения были найдены в кишечнике у нематод, чей пищеварительный тракт был изучен на ультраструктурном уровне [5]. Рентгеновский анализ концентрических включений нематод *Trichuris suis* и *T. murk* показал, что они имеют высокое содержание кальция, а дополнительное присутствие фосфора позволяет предположить, что основным компонентом включения является фосфат кальция. Кроме того, во включениях были найдены следы магния, железа и калия [5]. Функция этих включений неизвестна. Большинство авторов склоняются к мысли, что это экскреты: связанные в физиологически и химически неак-

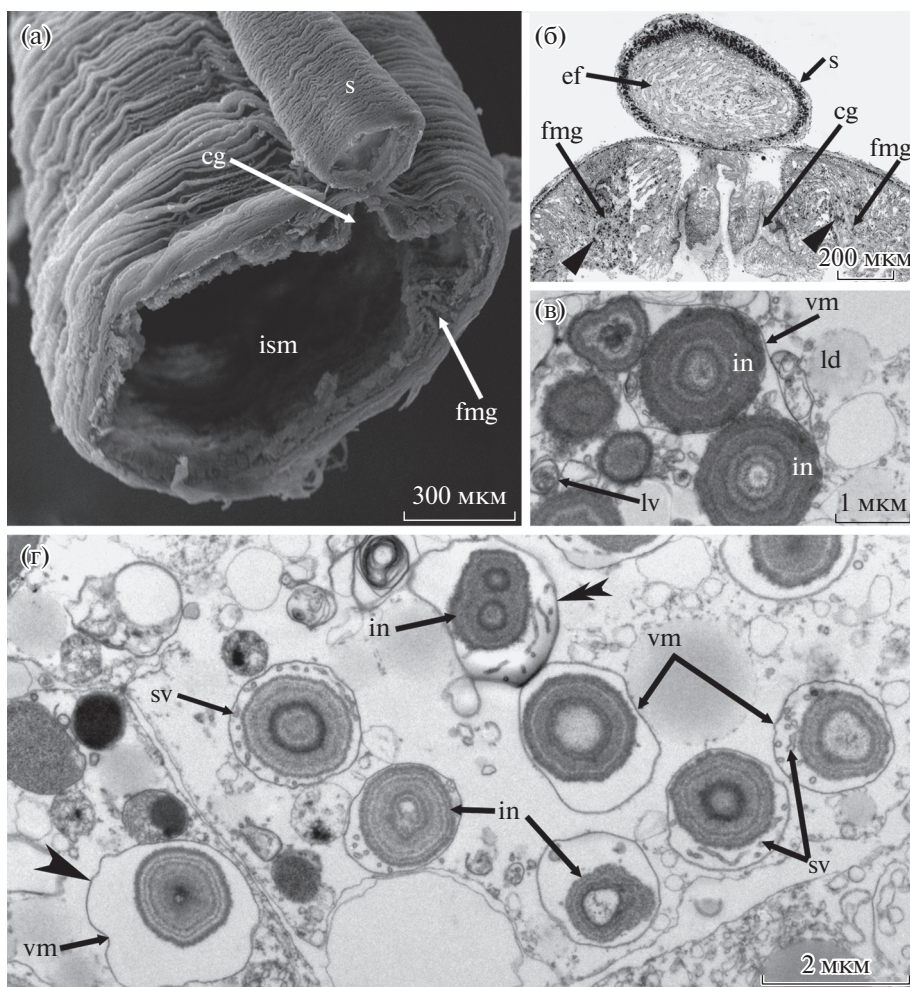


Рис. 1. Строение сифонального отдела средней кишки самки *Bonellia viridis*. (а) – Участок сифонального отдела средней кишки на срезе (СЭМ). (б) – Участок средней кишки с сифоном на поперечном полутонком срезе. Концентрические включения в клетках указаны прямыми наконечниками. (в) – Крупное скопление концентрических включений, окруженных общей мембраной (ТЭМ). (г) – Разные типы концентрических включений: с двумя ацентрическими областями (двойной наконечник), с мембранным пространством, лишенным везикул (вогнутый наконечник) (ТЭМ). Обозначения: (cg) – ресничный желобок, (ef) – складки эпителия сифона, (fmg) – складка эпителия средней кишки, (in) – концентрические включения, (ld) – липидные капли, (lsm) – просвет сифонального отдела средней кишки, (lv) – крупные везикулы, (s) – сифон, (sv) – мелкие мембранные пузырьки, (vm) – мембрана вакуоли.

тивные соединения – продукты метаболизма. Есть, однако, и другое мнение о природе этих необычных включений – фон Бранд и Вайнбах [6] показали, что концентрические включения тегумента ленточных червей способны быстро поглощать и высвобождать фосфат [6]. Фосфат кальция, содержащийся в концентрических включениях, мог бы стать эффективным средством связывания и, в конечном счете, устранения некоторых отходов метаболизма [6].

Возможно, специфические концентрические включения, обнаруженные в клетках средней кишки у *B. viridis*, выполняют функцию депо ионов для связывания агрессивных химических агентов, которые в избытке присутствуют в глубоких анаэробных слоях ила. Поскольку эхиуриды

способны строить довольно глубокие норы, им приходится иметь дело со средами с высокими концентрациями сероводорода, сульфидов, сульфатов и фосфатов. Интересно, что исследованные нами экземпляры *B. viridis* были собраны на каменистом грунте, лишенном признаков анаэробной среды. Если предположение о функции концентрических включений как депо химических веществ для связывания агрессивных агентов из окружающей среды верно, то *B. viridis* имеют преадаптации к жизни в окислительно-восстановительных средах и способны использовать включения при попадании в такие условия. То есть при необходимости ионы, содержащиеся в концентрических включениях, поступают в просвет кишки, связываются с агрессивными хими-

ческими веществами из окружающей среды, деактивируют их и в форме химически неактивных соединений выводятся из организма.

С другой стороны, сами эти включения могут являться продуктами связывания агрессивных химических агентов и формой их инактивации в клетках кишечного эпителия.

Достоверность обоих этих допущений может быть проверена лишь при наличии дополнительных биохимических, ультраструктурных данных и результатов рентгеновского элементарного анализа. Новые данные по строению и составу этих загадочных включений прольют свет на их происхождение и функции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность Александру Вадимовичу Ересковскому за сбор и фиксацию материала, Алексею Валерьевичу Чесунову и Владимиру Владимировичу Юшину за ценные научные консультации по теме исследования. Авторы благодарны коллективу межкафедральной лаборатории

электронной микроскопии МГУ имени М.В. Ломоносова за обеспечение сеансов СЭМ и ТЭМ.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 20-04-00096).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goto R. // Mol. Phylogenet. Evol. 2016. V. 99. P. 247–260.
2. Pilger J.F. Echiura. Microscopic Anatomy of Invertebrates. Wiley-Liss Inc., New York, 1993. V. 12. P. 185–236.
3. Temereva E.N., Kuznetsov P.A., Kiseleva E.A. // Rus. J. Mar. Biol. 2017. V. 43. № 6. P. 453–470.
4. Menon J.G., Arp A.J. // Invertebr. Biol. 1998. V. 117. № 4. P. 307–317.
5. Jenkins, T., Erasmus, D.A., & Davies, T.W. // Exp. Par. 1977. V. 41. №. 2. P. 464–471.
6. Von Bhand T., Weinbach E.C. // Zeitschrift fiir Parasitenkunde. 1975. V. 48 P. 53–63.

CONCENTRIC INCLUSIONS IN THE INTESTINE EPITHELIUM OF ECHIURA *BONELLIA VIRIDIS*: STRUCTURE AND POSSIBLE FUNCTION

P. A. Kuznetsov^a and E. N. Temereva^{a,#}

^a Lomonosov Moscow State University Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: temereva@mail.ru

Presented by academician of the RAS V.V. Malakhov

The study of the anatomy and fine structure of Echiura is of great importance for understanding of the biology of these animals, which lead a hidden lifestyle and dominate various benthic communities. The use of scanning and transmission electron microscopy allowed to obtain the first data on the organization of the siphonal part of the midgut of *Bonellia viridis* females. For the first time, unusual concentric inclusions with certain fine structure are discovered in the cells of the midgut. These concentric inclusions have the same fine organization as concentric inclusions in the gut of many nematode species and in tegument of some flatworms. For these animals, it is known that concentric inclusions play an important role in binding of chemical agents inherent in redox environments. Interestingly, the studied individuals of *B. viridis* were found on the surface of a substrate devoid of signs of a redox environment. The new results indicate that *B. viridis*, and, possibly, all echiurids, have preadaptations to life in redox environments. New data on the structure and composition of concentric inclusions will shed light on their origin and function.

Keywords: Echiura, Annelida, morphology, intestine, concentric inclusions, redox environment

УДК 612.821.6

ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И “НЕОТЕНИЧЕСКИЙ” СОН У ГОЛОГО ЗЕМЛЕКОПА (*Heterocephalus glaber*) В УСЛОВИЯХ ИЗОЛЯЦИИ

© 2021 г. В. М. Ковальзон^{1,*}, О. А. Аверина², М. Ю. Высоких²

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 23.09.2020 г.

После доработки 02.10.2020 г.

Принято к публикации 03.10.2020 г.

Впервые проведена непрерывная регистрация двигательной активности и электроэнцефалограммы в течение 40 сут у четырех особей голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) в условиях изолированного содержания в лаборатории. Обнаружена четкая циркадианная ритмика двигательной активности, с постепенным ее снижением в течение ночи и подъемом в течение дня, сохранявшаяся как в режиме 12L/12D, так и в условиях полной темноты. Состояния покоя занимали в среднем около половины времени суток. Отмечались как типичные, так и атипичные по структуре периоды сна, в которых эпизоды быстрого сна предшествовали эпизодам медленного. Процент быстрого сна был необычно высоким (до 50% всего сна). В ЭЭГ регистрировали при этом синхронизированный двухфазный высокоамплитудный ритм с частотой 12–16 Гц. Кроме этого, отмечались трудно идентифицируемые периоды сна, совмещающие элементы и медленного, и быстрого сна. Структура сна голых землекопов напоминает таковую у эволюционно древних видов, а также “неорганизованный” сон, характерный для ранних стадий онтогенеза у незрелорожденных млекопитающих.

Ключевые слова: сон-бодрствование, циркадианный ритм, двигательная активность, голые землекопы

DOI: 10.31857/S2686738921010133

Голые (точнее, бесшерстные) землекопы (*Heterocephalus glaber*) — одни из самых удивительных и загадочных наземных млекопитающих [1–3]. Они обитают в аридных зонах Северо-Восточной Африки (Эфиопия, Кения, Сомали), живут под землей большими колониями по несколько десятков или даже сотен животных. При этом у них, как у пчел, размножается только одна самка (“королева”, или “матка”) огромного размера, которую оплодотворяет один или несколько самцов. Все остальные особи — “рабочие”, вторичные половые признаки у них редуцированы и пол определяется только путем генотипирования. Землекопы не болеют, не стареют, очень долго живут, устойчивы к гипоксии и гиперкапнии и т.д., и поэтому привлекают пристальный интерес представителей самых разных наук [2–4]. Экология, морфология, биохимия, генетика и молекулярная биология этого вида изучены неплохо [1, 3, 4], че-

го нельзя сказать о его физиологии. Последняя в значительной степени основана лишь на единичных отрывочных наблюдениях [5–7]. Недавно мы провели более детальное исследование динамики ритмов активности-покоя и температуры тела у четырех представителей этого вида, находящихся внутри своей колонии в специальных условиях лаборатории. При этом был обнаружен оригинальный тип циркадианной ритмики — с высоким уровнем двигательной активности в дневное время, независимым от освещенности и сочетающимся, несмотря на мышечную активность, с резким *падением* температуры тела, вплоть до комнатной (28°C), как бы “вопреки” второму закону термодинамики. По прекращении двигательной активности температура тела быстро поднималась обратно до среднего уровня 33.5°C [8].

Целью настоящей работы было определение ранее не известной структуры цикла бодрствование-сон у голых землекопов, помещенных в условия изоляции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Землекопы поступили из источника в Берлинском зоопарке и были уже не первым поколением, выросшим в неволе. Это были взрослые особи, возрастом около трех лет и весом: самцы — 37

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

² Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
*e-mail: kovalzon@sevin.ru

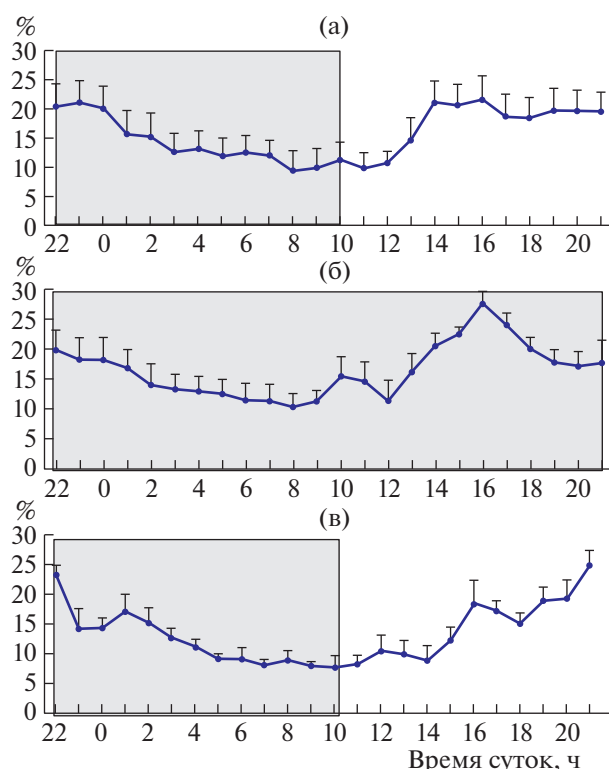


Рис. 1. (а) Усредненная почасовая двигательная активность четырех голых землекопов за 8 сут ($M \pm S.E.M.$) при световом режиме 12L/12D (свет включается в 10 ч и выключается в 22 ч). По оси абсцисс – время суток в часах. По оси ординат – показания акселерометра в %% (100% = 1g). (б) То же, за 8 сут в полной темноте. (в) То же, за 5 сут после возвращения прежнего режима 12L/12D.

и 46 г, самки – 44 и 45 г. Исследование одобрено биоэтическим комитетом ИПЭЭ РАН. Отобранные для экспериментов животные были извлечены из своих “родных” колоний и помещены в индивидуальные боксы из оргстекла размером 20 × 20 × 45 см. В качестве подстила на дне камер находился 3–5 см слой щепы. Адаптация к условиям изолированного содержания продолжалась 10 сут при световом режиме 12L/12D. Яркий белый свет включался в 10 ч и выключался в 22 ч. Кормление животных проводилось ежедневно между 18 и 20 ч.

Операцию проводили под общим наркозом (золетил 35–40 мг/кг + медитин 7 мг/кг). Каждому животному вводили 5 электродов для регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ): 2 лобных, 2 теменных и референтный в затылочную кость. После операции землекопы были помещены обратно в свои индивидуальные камеры. Каждое животное было постоянно подключено с помощью гибкого кабеля к входу миниатюрного 2-канального автономного усилителя биопотенциалов, снабженного 3D акселерометром и пере-

дающего сигналы на компьютер по каналу *blue-tooth*. Конструкция отведения дает возможность регистрировать ЭЭГ, не ограничивая свободу перемещений животного, а акселерометр реагирует даже на небольшие его движения. ЭЭГ регистрировали с частотой дискретизации 250 Гц, а двигательную активность – с частотой 50 Гц. Проводили визуальный анализ полученных ЭЭГ записей *off-line* по 20-секундным эпохам с помощью специальной программы [9]. По общепринятым критериям для грызунов выделяли состояния бодрствования, медленного и быстрого сна.

Регистрация двух каналов ЭЭГ (лобно-теменные отведения) и двигательной активности началась сразу по окончании операции и продолжалась непрерывно 40 сут. Регистрация сопровождалась видеомониторингом. В первые 3 нед после операции животные находились при том же световом режиме 12L/12D, что и в период адаптации. Затем в течение 1 нед животные пребывали в условиях полной темноты. Во время раздачи животным корма, в период между 18 и 20 ч, включали слабый красный свет. По истечении недельного периода пребывания в полной темноте животных вновь переводили в прежний режим 12L/12D еще на одну неделю – до окончания опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все четверо землекопов хорошо перенесли перемещение в индивидуальные боксы. На рис. 1 видна четкая циркадианная ритмика двигательной активности животных, с постепенным ее снижением в течение ночи и подъемом в течение дня, сохранявшаяся как в режиме 12L/12D, так и в режиме полной темноты. Поведение животных в периоды активности состояло преимущественно из резких, быстрых движений: бега по камере, еды, копания подстилки, имитации рытья коридоров. Периоды покоя (рис. 2) составляли в сумме (в среднем) около половины времени суток. Цикличность сна была слабо выражена. Отмечались как “классические” периоды сна с чередованием эпизодов медленного (МС) и быстрого сна (БС) (рис. 3–5), так и эпизоды атипического сна, когда периоды БС предшествовали эпизодам МС. Некоторые эпизоды МС сочетались с мышечными подергиваниями. Эпизоды БС наблюдались как без подергиваний, так и с подергиваниями – иногда чрезвычайно сильными. Процент быстрого сна был необычно высоким (до 50% всего сна).

В ЭЭГ регистрировали при этом синхронизированный двухфазный ритм, нарастающей, порой огромной, амплитуды, с частотой 12–16 Гц, в 2 раза превышающей обычный регулярный гиппокампальный тета-ритм, характерный для быстрого сна грызунов (6–8 Гц) (рис. 5). Такая электрическая активность головного мозга ранее не была описана ни у одного вида животных. Кроме



Рис. 2. Спящий голый землекоп во время регистрации.

этого, отмечались трудно идентифицируемые (так называемые “недифференцированные”) периоды сна, совмещающие элементы и медленного, и быстрого сна.

Эти особенности сна, а именно: (1) слабо выраженная цикличность; (2) чрезвычайно высокий процент быстрого сна (больше, чем у всех ныне исследованных видов взрослых млекопитающих и птиц); (2) эпизоды быстрого сна, опережающие периоды медленного сна; (3) мышечные подергивания

вания не только во время быстрого, но и во время медленного сна; (4) наличие “недифференцированных” эпизодов сна – все это резко отличает характеристики сна голых землекопов от таковых, свойственных большинству изученных видов млекопитающих и птиц [10–13]. Отдельные перечисленные выше признаки цикла бодрствование–сон отмечены у таких эволюционно древних видов, как страус, утконос [14], броненосец [15, 16], хорек [17], а также напоминают “неорганизованный” сон, характерный для ранних стадий постнатального онтогенеза у незрелорожденных (*altricial*) млекопитающих [18]. Однако вся совокупность таких признаков формирует уникальную структуру сна голых землекопов, не похожую ни на один из всех ныне полисомнографически изученных видов (более 100) млекопитающих. В работе [3] была высказана гипотеза о том, что главной особенностью организма голых землекопов является неотения, т.е. сохранность ювенальных черт в зрелом возрасте. Настоящее исследование вполне согласуется с таким предположением.

Несомненно, что дальнейшее тщательное изучение цикла бодрствование–сон голых землекопов представляет значительный интерес, и его

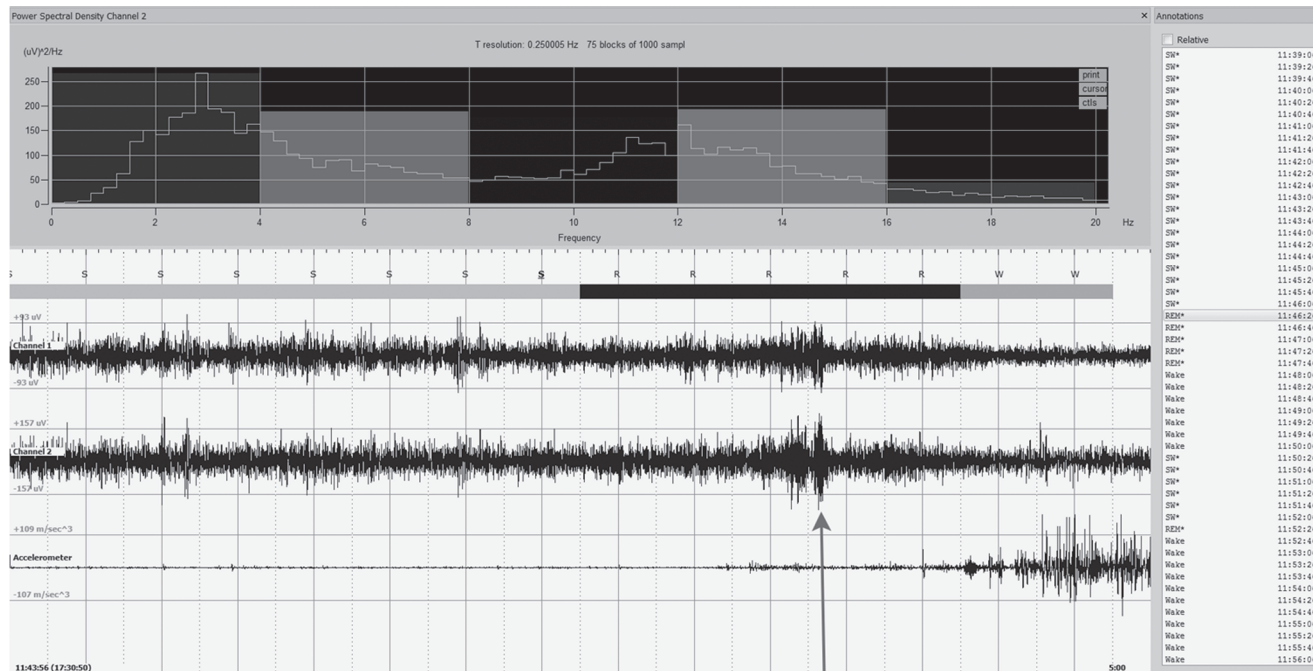


Рис. 3. 5-минутный фрагмент записи сна землекопа № 8496♀, отстадивированный по 20-с эпохам. Нижняя часть графика (светлый фон) – регистрация 2 каналов ЭЭГ (лобно-затылочные отведения, Channel 1 – левое, Channel 2 – правое) и двигательной активности (Accelerometer). Вертикальные линии – отметки времени (20 с). Калибровка сигналов – слева (μV для ЭЭГ, m/sec^3 для 3D акселерометра). Над ЭЭГ – отметка стадирования по 20-с эпохам: S – медленный сон (светлосерая полоса), R – быстрый сон (черная полоса), W – бодрствование (темно-серая полоса). Верхний график (темный фон) – усредненный спектральный анализ 2-го канала ЭЭГ. По оси абсцисс – частота (Hz). По оси ординат – мощность сигнала ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$). Столбец справа – результат стадирования текущего отрезка записи.

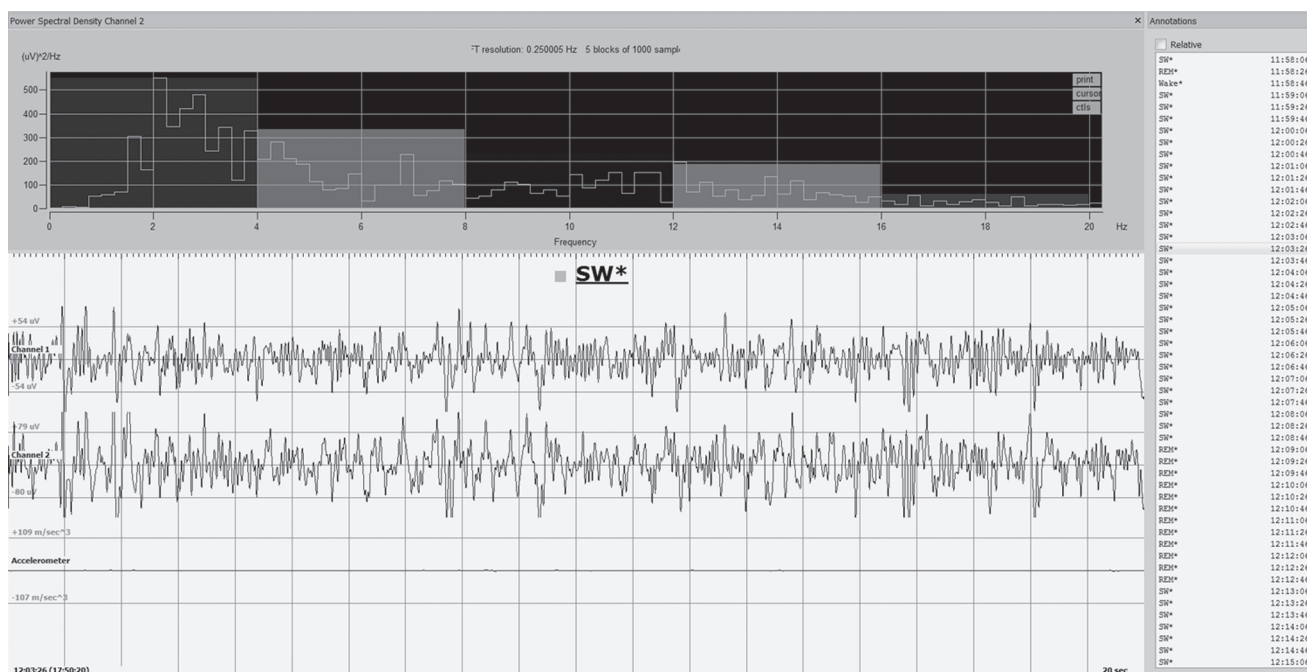


Рис. 4. 20-секундный эпизод записи медленного сна из предыдущего фрагмента. Прочие обозначения – как на рис. 3.

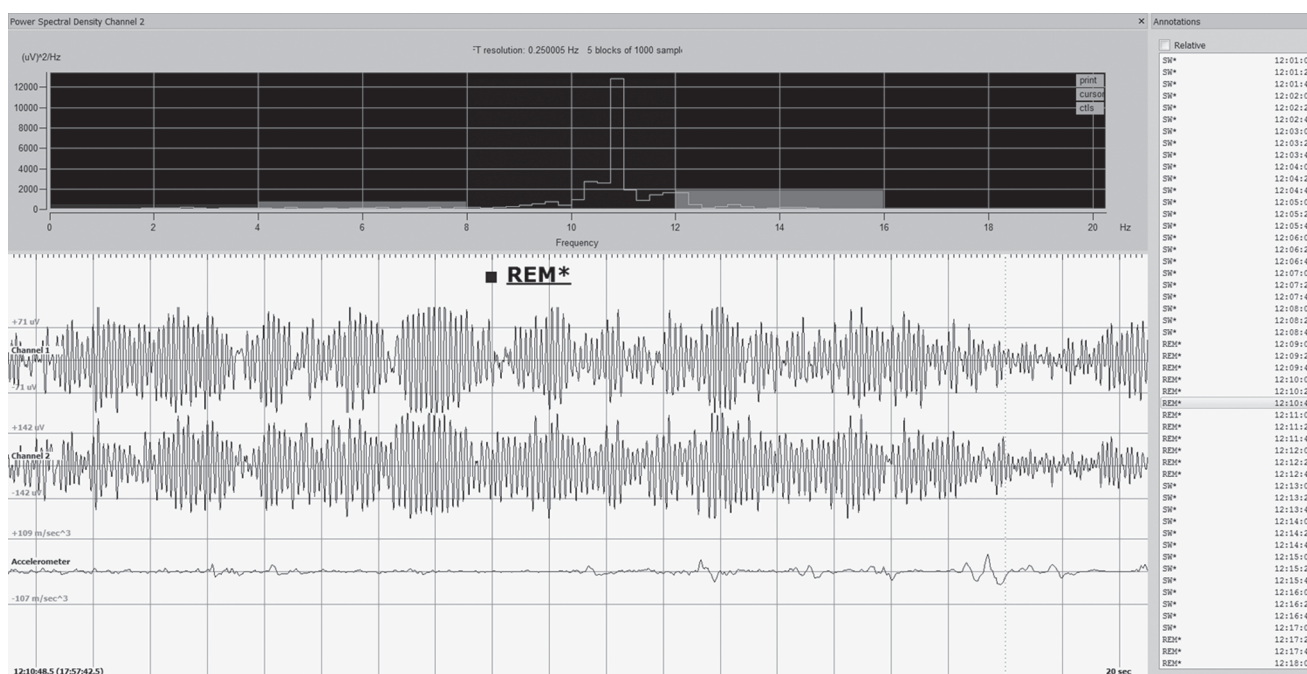


Рис. 5. 20-секундный эпизод записи быстрого сна, отмеченный стрелкой на рис. 3. Прочие обозначения – как на рис. 3.

необходимо провести на более представительной выборке животных.

и Г.Н. Фесенко за помощь в организации и проведении данного исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят академика РАН В.П. Скулачева, с чьего любезного разрешения эта работа была проведена в стенах его лаборатории, а также И.В. Жданову

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования В.М. Ковальсона поддержаны грантом РФФИ (проект № 17-15-01433-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Browe B.M., Vice E.N., Park T.J. // *Anat. Rec.* 2020. V. 303. № 1. P. 77–88.
2. Kupferschmidt K. // *Science.* 2018. V. 359. № 6375. P. 506–507.
3. Skulachev V.P., Holtze S., Vyssokikh M.Y., et al. // *Physiol. Rev.* 2017. V. 97. P. 699–720.
4. Schuhmacher L.-N., Husson Z., Smith E. // *Open Access Anim. Physiol.* 2015. V. 7. P. 137–148.
5. Herold N., Spray S., Horn T., Henriksen S.J. // *J. Neurosci. Meth.* 1998. V. 81. P. 151–158.
6. Davis-Walton J. // *Naturwissenschaften.* 1994. V. 81. P. 272–275.
7. Riccio A.P., Goldman B.D. // *Physiol. Behav.* 2000. V. 71. P. 1–13.
8. Ковальзон В.М., Аверина О.А., Минков В.А., и др. // *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2020. Т. 56. № 5. С. 117–124.
9. Manolov A.I., Koval'zon V.M., Ukraintseva Yu.V., et al. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2017. V. 47. №. 1. P. 97–101.
10. Лямин О.И. // Эффективная фармакотерапия. Неврология и психиатрия. Спецвыпуск “Сон и его расстройства – 6”. 2018. Т. 35. С. 8–14.
11. Anafi R.C., Kayser M.S., Raizen D.M. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. P. 109–116.
12. Blumberg M.S., Lesku J.A., Libourel P.-A., Schmidt M.H., Rattenborg N.C. // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. P. R38–R49.
13. Ungurean G., van der Meij J., Rattenborg N.C., Lesku J.A. // *Curr. Opin. Physiol.* 2020. V. 15. P. 111–119.
14. Lesku J.A., Meyer L.C.R., Fuller A., et al. // *PLoS ONE.* 2011. V. 6. № 8. Paper e23203.
15. Prudom A., Klemm W.R. // *Physiol. Behav.* 1973. V. 10. P. 275–282.
16. Van Twyver H., Allison T // *Brain, Behav. Evol.* 1974. V. 9. P. 107–120.
17. Jha S.K., Coleman T., Frank M.G. // *Behav. Brain Res.* 2006. V. 172. № 106–113.
18. Frank M.G., Heller H.C. // *J. Sleep Res.* 2003. V. 12. P. 25–34.

MOTOR ACTIVITY AND “NEOTENIC” SLEEP IN THE NAKED MOLE RAT (*Heterocephalus glaber*) UNDER ISOLATION

V. M. Kovalzon^{a, #}, O. A. Averina^b, and M. Yu. Vysokikh^b

^a Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: kovalzon@sevin.ru

Presented by academician of the RAS V.V. Rozhnov

For the first time, continuous registration of motor activity and electroencephalogram for 40 days was carried out in four individuals of the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) in isolated conditions in the laboratory. A clear circadian rhythm of motor activity was found, with a gradual decrease during the night and an increase during the day, which remained both in the 12L/12D mode and in conditions of complete darkness. The rest states occupied, on average, about half the time of the day. There were both typical and atypical sleep periods, in which REM sleep episodes preceded NREM sleep periods. REM sleep percentage was unusually high (up to 50% of the total sleep time). During REM sleep episodes, a synchronized two-phase high-amplitude rhythm with a frequency of 12–16 Hz was recorded in the EEG. In addition, there were hard-to-identify periods of sleep, combining elements of both NREM and REM sleep. The sleep structure of naked mole rats resembles that of evolutionarily ancient species, as well as the “disorganized” sleep characteristic of the early stages of ontogenesis in altricial mammals.

Keywords: sleep-wakefulness, circadian rhythm, motor activity, naked mole rats

УДК 595.132

ОСОБЕННОСТИ ИННЕРВАЦИИ ЩУПАЛЕЦ *Flustrellidra hispida* И ЭВОЛЮЦИЯ ЛОФОФОРА У Bryozoa

© 2021 г. М. А. Исаева¹, И. А. Косевич¹, Е. Н. Темерева^{1,*}

Представлено академиком РАН В.В. Малаховым

Поступило 01.10.2020 г.

После доработки 13.10.2020 г.

Принято к публикации 15.10.2020 г.

Изучение организации лофофора имеет большое значение для анализа филогении Lophophorata и понимания путей эволюционных преобразований внутри каждой группы лофофорных животных. Иннервация лофофора у мшанок *Flustrellidra hispida* изучена методами иммуоцитохимии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Впервые показано, что у этого вида имеется внешнее нервное кольцо, которое дает начало нервам, иннервирующим щупалеца. Ранее внешнее нервное кольцо было описано у других Stenostomata, а также у Cyclostomata. Однако у ранее исследованных видов внешнее нервное кольцо не связано с какими бы то ни было нервами. Обнаруженная особенность иннервации лофофора *F. hispida* позволяет предполагать эволюционный ряд трансформации лофофора мшанок от гипотетического форонидоподобного предка с крупным внешним нервным кольцом и отходящими от него многочисленными нервами щупалец, к сложному колоколообразному лофофору *F. hispida* с выраженным внешним нервным кольцом и немногочисленными щупальцевыми нервами, к другим ктеностоматам, внешнее нервное кольцо которых не связано со щупальцевыми нервами, и далее к хейлостоматам, у которых внешнее нервное кольцо отсутствует вовсе.

Ключевые слова: Lophophorata, лофофор, нервная система, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

DOI: 10.31857/S2686738921010108

Мшанки (Bryozoa) – отдельный тип беспозвоночных животных, положение которого на древе Bilateria до сих пор точно не определено. Согласно данным молекулярной филогенетики мшанки либо стоят особняком от всех других Lophotrochozoa, либо вместе с Kamptozoa и Cyclophora формируют кладу Polyzoa [1, 2]. Однако традиционно мшанки рассматриваются в составе надтиповой группы Lophophorata, которая, кроме мшанок, включает форонид и брахиопод. Монофилия лофофорат была подтверждена результатами сравнительно-анатомического анализа [3, 4], а также новыми данными молекулярно-генетического анализа [5, 6]. Для всех лофофорат характерно наличие особого щупальцевого органа – лофофора, который, вероятно, появился у далекого общего предка лофофорат и затем по-разному эволюционировал у форонид, брахиопод и мшанок [4]. Мнения о путях эволюционных пре-

образований лофофора у мшанок противоречивы [3, 7, 8].

Целью настоящей работы было изучение иннервации лофофора у ктеностоматной мшанки *Flustrellidra hispida*.

Материалом для работы послужили колонии *Flustrellidra hispida* (Fabricius, 1780), собранные в окрестностях беломорской биологической станции МГУ имени М.В. Ломоносова (ББС МГУ). Зооиды расслабляли в растворе MgCl₂ и фиксировали 4% параформальдегидом на 0.1М фосфатном буфере. После отмывки в фосфатном буфере с 5% Triton-X100 зооиды инкубировали в блокр-растворе с 1% бычьим сывороточным альбумином, 0.1% cold fish skin gelatin, 0.5% Triton-X100 и 0.05% Tween 20 в течение 24 ч. Подготовленный материал инкубировали при +4°C в течение 72 ч в растворе первичных антител к серотонину и тиронизированному альфа-тубулину. После отмывки в блокр-растворе зооидов инкубировали во вторичных антителах, отмывали, заключали в смесь бензилового спирта и бензил-бензоата и просматривали в лазерном конфокальном микроскопе Nikon Eclipse Ti (Tokyo, Japan), установленном

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: temereva@mail.ru

на ББС МГУ. Z-проекция была сделана в программе ImageJ 1.43.

Flustrellidra hispida имеет колоколообразный лофофор, несущий 26 щупалец. Каждое щупальце *F. hispida* иннервируется двумя продольными нервами — фронтальным и абфронтальным (рис. 1а). Абфронтальный нерв очень крупный, состоит из большого числа нервных волокон и связан с ресничными сенсорными органами, расположенными вдоль абфронтальной стороны каждого щупальца. Абфронтальный щупальцевый нерв начинается двумя крупными корешками от длинных, тонких межщупальцевых нервов, которые тянутся от циркуморального нервного кольца. Каждый межщупальцевый нерв имеет сложное строение: в его состав входят как нервные тракты, идущие непосредственно от церебрального ганглия, так и крупный аксон серотонинэргической чувствительной клетки, которая располагается между щупальцами. Всего у *F. hispida* насчитывается 24 такие клетки, располагающиеся с внутренней стороны лофофора, однако, чувствительный жгутик которых проходит между щупальцами с внешней стороны лофофора. Циркуморальное нервное кольцо состоит из двух частей, расположенных одна над другой (рис. 1а). Нижняя часть циркуморального нервного кольца формируется межщупальцевыми нервами, которые проходят вокруг глотки, частично сливаются друг с другом, формируя более крупные нервные тракты, и переходят в латеральный нервный плексус церебрального ганглия. Верхняя часть циркуморального нервного кольца связана с церебральным ганглием тонкими латеральными корешками и представляет собой крупный пучок нервных волокон, имеющий форму полукольца, разомкнутого на оральной стороне тела. От верхней части циркуморального нервного кольца берут начало фронтальные нервы щупалец.

У *F. hispida* было обнаружено внешнее нервное кольцо, проходящее по периметру лофофора с его внешней стороны (рис. 1а). Наружное нервное кольцо образовано двумя-тремя нервными волокнами, которые демонстрируют и серотонинэргическую (рис. 1в), и тубулинэргическую (рис. 1в) иммунореактивность. Наружное нервное кольцо связано с тонкими серотонинэргическими нейритами, которые проходят с внешней стороны щупальцевой ламеллы до групп внешних серотонинэргических клеток и дальше к одному из корешков абфронтального щупальцевого нерва (рис. 1б). Эти нейриты входят в состав абфронтальных нервов и проходят вдоль всего щупальца.

Иннервация лофофора мшанок исследована довольно подробно для представителей основных групп: Phylactolaemata, Cyclostomata и Gymnolaemata, включая Stenostomata и Cheilostomata [3, 7,

10, 11]. Для всех исследованных видов характерно наличие циркуморального нервного кольца, связанного с крупными межщупальцевыми серотонинэргическими перикариями, и от которого берут начало щупальцевые нервы. Число щупальцевых нервов может быть различно и варьирует от 2 до 6 у представителей разных групп. Наиболее сложно иннервированы щупальца у филактолематных и циклостоматных мшанок — в каждом щупальце у них проходит 6 нервных трактов: медиофронтальный, медиоабфронтальный, пара латерофронтальных и пара латероабфронтальных. У большинства голоротых мшанок в каждом щупальце проходит 4 нервных тракта: медиофронтальный, медиоабфронтальный и пара латерофронтальных. Из голоротых мшанок 2 раза подряд только 2 нервных тракта, проходящих вдоль всего щупальца: медиофронтальный и медиоабфронтальный. Как показывают результаты настоящей работы, другая ктеностоматная мшанка — *F. hispida* — также имеет всего два нервных тракта в каждом щупальце. Возможно, наличие двух нервных трактов в щупальцах — это общая черта иннервации щупалец у Stenostomata. У других лофофорат — форонид и брахиопод — наиболее типичное число щупальцевых нервов — 6. Если отталкиваться от идеи монофилии Lophophorata, то уменьшение числа щупальцевых нервных трактов у мшанок следует рассматривать как вторичное явление.

Особенностью иннервации щупалец у *F. hispida* является наличие выраженного внешнего нервного кольца, дающего начало серотонинэргическим нейритам абфронтальных щупальцевых нервов. Внешнее нервное кольцо впервые было описано у *A. gracilis* [3], а затем обнаружено у нескольких представителей циклостоматных мшанок — *Crisia eburnea* [9] и *Cinctipora elegans* [10]. Необходимо отметить, что у всех упомянутых видов мшанок внешнее нервное кольцо не участвует в иннервации щупалец и не связано ни с какими щупальцевыми нервами. Более того, оно не дает и никаких других нервов. В этом контексте внешнее нервное кольцо *F. hispida* представляется структурой гораздо более сложной, чем это считалось ранее для других видов мшанок.

Согласно данным сравнительно-анатомического анализа внешнее нервное кольцо мшанок может быть гомологизировано со щупальцевым нервным кольцом форонид и нижним брахиальным нервом брахиопод [4, 12]. И у форонид, и у брахиопод эти нервы участвуют в иннервации щупалец и дают начало абфронтальным и латероабфронтальным щупальцевым нервам. Если исходить из идеи монофилии Lophophorata, то наличие внешнего нервного кольца, принимающего участие в иннервации щупалец, вероятно, следует рассматривать как анцестральное состояние, тогда как редукция внешнего нервного коль-

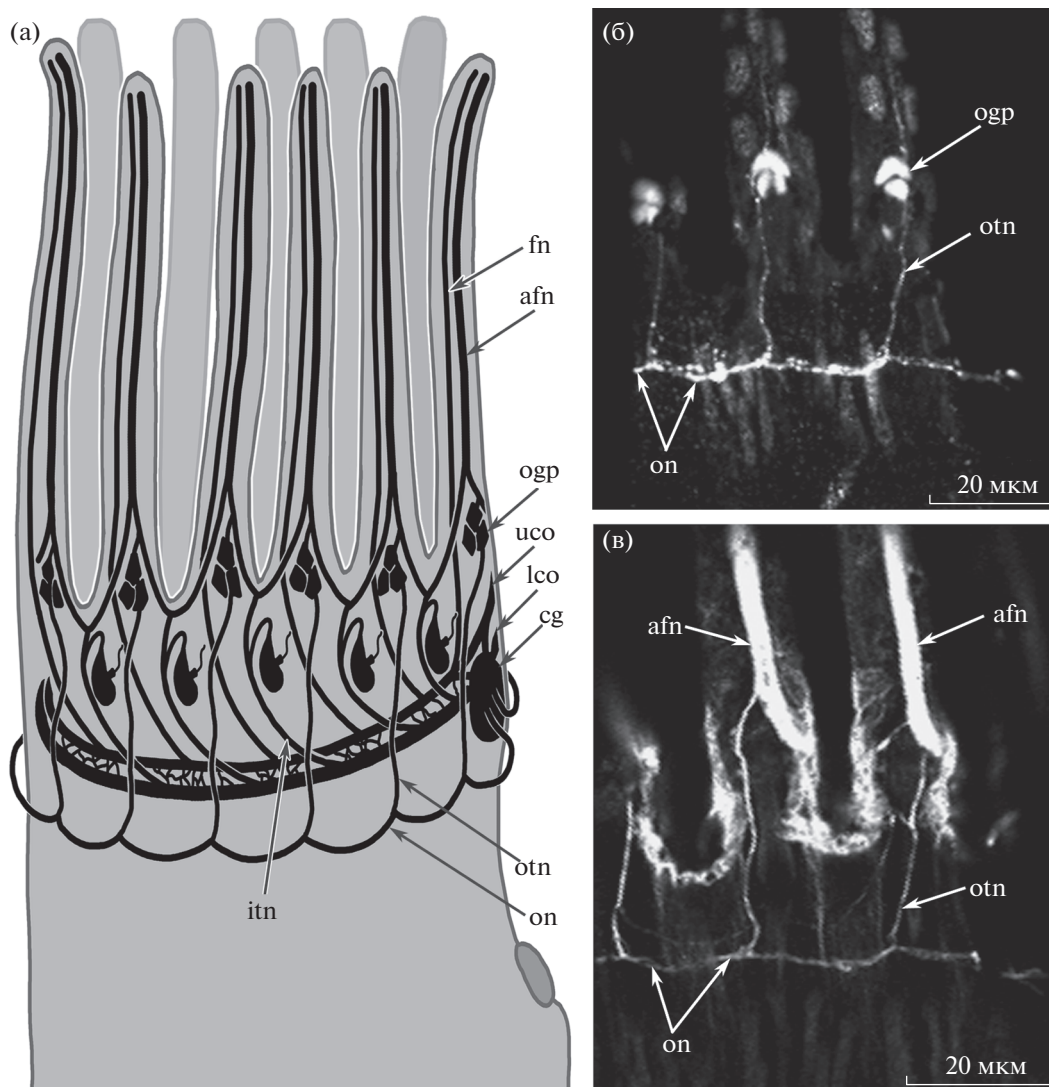


Рис. 1. Иннервация щупалец у мшанки *Flustrellidra hispida*. (а) – Схема нервных трактов лофофора, основанная на данных иммуноцитохимического окрашивания антителами к серотонину и тиронизированному альфа-тубулину. Число щупалец уменьшено. (б) – Максимальная Z-проекция четырех слайдов из стека с оральной стороны тела. Окраска антителами к серотонину. (в) – Максимальная Z-проекция четырех слайдов из стека с оральной стороны тела. Окраска антителами к тиронизированному альфа-тубулину. Обозначения: (afn) – абфронтальный щупальцевый нерв, (cg) – церебральный ганглий, (fn) – фронтальный щупальцевый нерв, (itn) – межщупальцевый нерв, (lco) – нижняя зона циркуморального нервного кольца, (ogp) – группы внешних щупальцевых перикариев, (on) – наружное нервное кольцо, (otn) – внешние нервы, (uco) – верхняя зона циркуморального нервного кольца.

ца и связанных с ним щупальцевых нервов – это вторичное явление, связанное, возможно, с уменьшениями размеров тела и лофофора. В этом случае эволюционные преобразования лофофора мшанок можно представить как следующий гипотетический ряд: (i) анцестральный относительно сложный лофофор с большим числом щупалец и двумя нервными кольцами, дающими начало крупным щупальцевым нервам; (ii) состояние, описанное в настоящей работе для *F. hispida* – наличие двух нервных колец, из которых внешнее дает лишь тонкие нейриты в щупальца, а внутреннее осуществляет основную иннервацию щупалец;

(iii) состояние, описанное для *A. gracilis*, *C. eburnea* и *C. elegans* – наличие внешнего нервного кольца, никак не связанного с иннервацией щупалец; (iv) состояние, характерное для большинства Cheilostomata, – полное отсутствие внешнего нервного кольца и иннервация щупалец только от циркуморального нервного кольца.

С другой стороны, наличие лишь двух нервных трактов в щупальцах *F. hispida* может свидетельствовать об исходно небольших размерах лофофора, а увеличение числа щупалец, возможно, явление вторичное, которое и привело к появлению дополнительных нервных трактов у этого вида. В

то же время наличие внешнего нервного кольца у мшанок с очень небольшим лофофором (*A. gracilis*, *C. eburnea* и *C. elegans*) ставит под сомнение это предположение.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (№ 18-14-00082).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hejnol A., Obst M., Stamatakis A., Ott M., Rouse G.W., Edgecombe G.D., Martinez P., Baguñà J., Bailly X., Jondelius U., Wiens M. // Proceedings of the Royal Society B: Biol. Sciences. 2009. V. 276. № 1677. P. 4261–4270.
2. Kocot K.M., Struck T.H., Merkel J., Waits D.S., Todt C., Brannock P.M., Weese D.A., Cannon J.T., Moroz L.L., Lieb B., Halanych K.M. // Syst. Biol. 2017. V. 66. № 2. P. 256–282.
3. Temereva E.N., Kosevich I.A. // BMC Evol. Biol. 2016. V. 16. № 1. P. 1–24.
4. Temereva E.N. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 1–16.
5. Marletaz F., Peijnenburg K., Goto T., Satoh N., Rokhsar D. // Curr. Biol. 2019. V. 29. № 2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.042>
6. Zverkov O.A., Mikhailov K.V., Isaev S.V., Rusin L.Y., Popova O.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Moroz L.L., Panchin Y.V., Lyubetsky V.A., Aleoshin V.V. // Front Genet. 2019. V. 10. №. 443.
7. Schwaha T.F., Wanninger A. // BMC Evol. Biol. 2015. V. 15. № 223. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0508-9>
8. Schwaha T.F., Ostrovsky A.N., Wanninger A. // Biol. Rev. 2020. V. 95. P. 696–729.
9. Temereva E.N., Kosevich I.A. // Front. Zool. 2018. V. 15. № 1. P. 48.
10. Schwaha T.F., Handschuh S., Ostrovsky A.N., Wanninger A. // BMC Evol. Biol. 2018. V. 18. № 1. P. 92.
11. Worsaae K., Frykman T., Nielsen C. // Acta Zool. 2018. V. 101. № 2. P. 133–146.
12. Temereva E.N., Kosevich I.A. // Invertebr. Zool. 2018. V. 15. P. 366–372.

PECULIARITIES OF TENTACLES INNERVATION OF *Flustrellidra hispida* AND EVOLUTION OF LOPHOPHORE IN Bryozoa

M. A. Isaeva^a, I. A. Kosevich^a, and E. N. Temereva^{a, #}

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: temereva@mail.ru

Presented by academician of the RAS V.V. Malakhov

The study of the lophophore organization is of great importance for the reconstruction of lophophorates phylogeny and for understanding of evolutionary transformation occurred within each phylum of Lophophorata. The innervation of the lophophore of ctenostome bryozoan *Flustrellidra hispida* was studied by immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. It was shown for the first time that this species has an outer nerve ring, giving rise to the tentacle nerves. Formerly, the outer nerve ring was described in some ctenostomates and cyclostomates, but it has no connection to any nerves. The discovered feature of lophophore innervation of *F. hispida* allows to suggest the evolutionary transformation from a phoronida-like ancestor lophophore, bearing prominent outer nerve ring with numerous tentacle nerves emanating from it, to the complicated bell-shaped lophophore of *F. hispida* with well pronounced outer nervous ring bearing a few tentacle nerves. Next one in this hypothetical row will be the lophophore of the other ctenostomates and some cyclostomates with an outer nerve ring having no connection to any nerves, and cheilostomates lophophore, lacking an outer nerve ring at all.

Keywords: Lophophorata, lophophore, nervous system, confocal laser scanning microscopy

УДК 56.01/08:551.72

СЛЕДЫ ДРЕВНЕЙШИХ ТРОФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В РИФЕЙСКОЙ БИОТЕ (ЛАХАНДИНСКИЙ ЛАГЕРШТЕТТ, ЮГО-ВОСТОЧНАЯ СИБИРЬ)

© 2021 г. Ю. В. Шувалова^{1,2,*}, К. Е. Наговицин^{3,4}, П. Ю. Пархаев¹

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 15.09.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принято к публикации 29.10.2020 г.

В рифейской органостенной биоте лахандинского лагерштетта (1030–1000 млн лет, юго-восток Сибири) обнаружены следы повреждений оболочек различных эукариотических организмов. Повреждения близки к перфорациям, описанным из серий Академикербрен (750 млн лет, Шпицберген), Чуар (780–740 млн лет, США) и Шалер (1150–900 млн лет, Арктическая Канада). Обоснована биогенная природа перфораций. Предложена гипотеза перфорирования стенок микроорганизмов зооспоровыми грибами, обнаруженными в этих же отложениях. В то же время разнообразный таксономический состав “жертв” и отсутствие характерных морфологических особенностей перфораций не позволяет говорить об исключительно эукариотической природе сверлильщиков, и, следовательно, о том, что в рифее уже оформилось устойчивое избирательное хищничество среди протистов. Таким образом, одна из центральных гипотез причин взрывной диверсификации эукариот в позднем протерозое не находит палеонтологического подтверждения.

Ключевые слова: лахандинский лагерштетт, рифей, протерозой, перфорации, хищничество

DOI: 10.31857/S2686738921010200

Реконструкция экологии и этологии древних форм жизни, включая их трофические взаимодействия, является важнейшей задачей палеонтологии рифея – времени первой крупной диверсификации ядерных организмов в истории Земли. Рифейская диверсификация эукариот представляет собой одно из наиболее значимых событий в эволюции биосферы, но до сих пор нет единого мнения о причинах, запустивших этот процесс. Отчасти это обусловлено неполнотой палеонтологической летописи, типичной для всего докембрия, и незначительным объемом пород, обеспечивающих соответствующую сохранность ископаемых организмов.

Надежность интерпретации морфологии и систематики протерозойских ископаемых напря-

мую зависит от их концентрации в изучаемых образцах пород, а также от их типа и степени сохранности. Наиболее продуктивны в данном контексте лагерштетты – уникальные местонахождения, где благодаря особым условиям седименто- и литогенеза сохраняются детали строения ископаемых организмов, утраченные в обычных местонахождениях.

Один из таких лагерштеттов, заключенный в последовательности осадочных пород лахандинской серии верхнего рифея, располагается в среднем течении р. Май юго-восточной Сибири (рис. 1). Лахандинская серия объединяет четыре свиты (снизу вверх): кумахинскую, мильконскую, нельканскую и игниканскую [1].

Возраст серии определяется в интервале 1030–1000 млн лет, основываясь на абсолютных датировках из подстилающей керпыльской [2] и перекрывающей уйской [3] серий, а также из карбонатов мильконской свиты лахандинской серии [4]. Отложения лахандинского лагерштетта представлены аргиллитами и алевролитами кумахинской и нельканской свит.

Лагерштетт относится к бёрджесскому типу, где один из самых разнообразных комплексов древнейших эукариот представлен органостенными ископаемыми, сохранившимися в морских

¹ Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва, Россия

² Технологический университет Суинберна, Хоторн, Австралия

³ Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: pinmuse@gmail.com

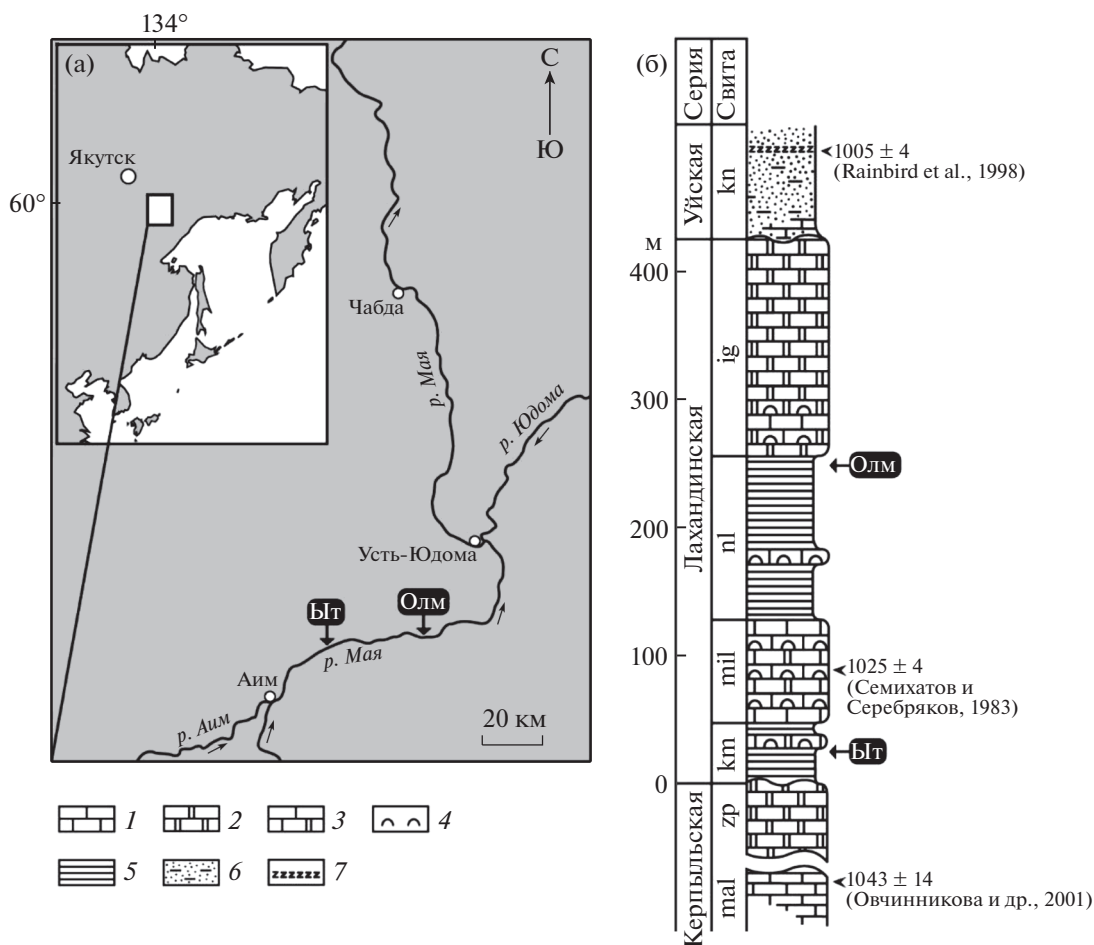


Рис. 1. Схема географического (а) и стратиграфического (б) положения разрезов Олемекен и Ытырында (литология по Семихатов, Серебряков, 1983, с дополнениями); разрезы: Олм – Олемекен в 1 км ниже устья руч. Олемекен, Ыт – Ытырында в 150 м ниже устья руч. Ытырында; свиты: mal – малгинская, zp – ципандинская, km – кумахинская, mil – мильконская, nl – нельканская, ig – игниканская, kp – кандыкская; литология: 1 – известняки, 2 – доломиты, 3 – доломитистые известняки, 4 – строматолиты, 5 – алевриты и песчаники, 7 – бадделейт.

глинистых породах. Комплекс дополняют еще неописанные эукариоты, обнаруженные нами в результате экспедиционных работ 2017–2019 гг. в разрезах Олемекен и Ытырында (рис. 1), а также в неопубликованных материалах из коллекций ИНГГ СО РАН. Одна из новых форм морфологически очень близка к зооспорангиям современных представителей сапролегниевых пероноспорицет, другая несет признаки хитридиевых грибов или пероноспорицет.

Ископаемые из лахандинского лагерштетта часто несут отпечатки разносортных зерен породы (рис. 2а, 2б), а также полигональные отверстия, образовавшиеся в результате повреждения органики кристаллами (рис. 2в, 2г). Данные виды дефектов важно дифференцировать от повреждений другого типа, морфология которых говорит об их биогенной природе. По размеру и форме эти повреждения объединяются в три группы.

К первой группе относятся круглые или овальные отверстия от 2.5 до 20 мкм в диаметре с ровной кромкой (рис. 3). Закономерности в распределении перфораций не наблюдается – некоторые фоссилии покрыты сетью соприкасающихся отверстий (рис. 3а, 3б), а на других представителях того же вида отверстия относительно редки (рис. 3в, 3г). Это убедительно показывает, что данный вид перфораций не является морфологическим элементом оболочки ископаемых.

В разрезе Олемекен подобные отверстия отмечены на представителях нескольких таксонов. Самые многочисленны из них зооспоровые грибы (?) *Majasphaeridium carpogenum* (Hermann, 1979) Hermann, 1989, представленные плотными оболочками с шагреновой поверхностью, от округлой до неправильной формы (грушевидной, почковидной, состоящие из двух и более слившихся элементов), без складок смятия (рис. 3а–3г). Из нескольких десятков изученных экзем-

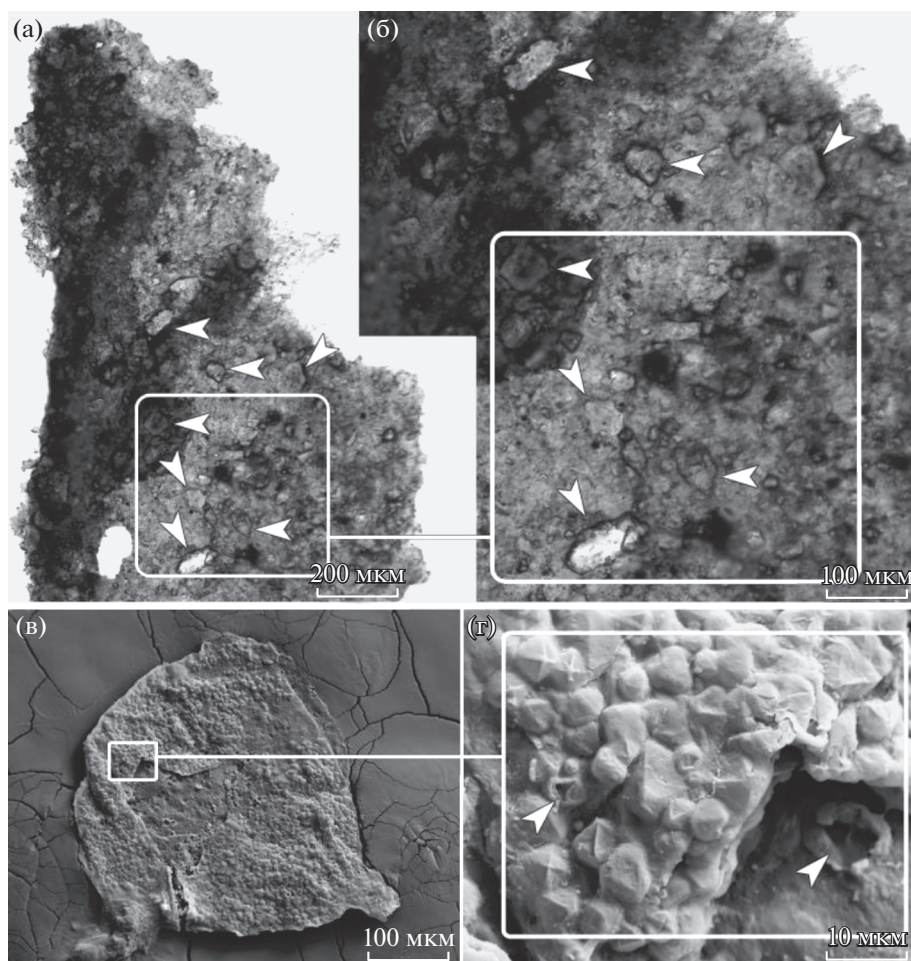


Рис. 2. Следы абиогенных повреждений на органических остатках из лахандинской серии: а, б — отпечатки зерен породы на поверхности органической пленки; кумахинская свита, разрез Ытырында; в, г — полигональные отверстия, образованные кристаллами пирита в стенке *Caudosphaera* sp. из игниканской свиты, разрез Олемекен; экз. ПИН, № 5805/1.

пляров более десяти несут описанные выше перфорации диаметром 5–9 мкм (рис. 3а–3г). Плотное расположенные отверстия подобного размера обнаружены на одном из трех экземпляров водорослей *Majaphyton antiquum* Timofeev et Hermann, 1976 (рис. 3д), а также на эллипсоидальной микрофоссилии (рис. 3е). Два экземпляра стриадных акритарх *Valeria lophostriata* (Jankauskas, 1979) Jankauskas, 1982 из этого разреза несут перфорации диаметром около 2.5 мкм, расположенные равномерно, без соприкосновения друг с другом (рис. 3ж, з).

Список перфорированных форм первой группы из разреза Ытырында включает две почти непрозрачные нескладчатые сферы диаметром 120 и 160 мкм с редкими неравномерно расположенными отверстиями диаметром 8 мкм, а также эллипсоидальную оболочку длиной 70 мкм и шириной 40 мкм с двумя отверстиями диаметром 5 мкм.

Ко второй группе можно отнести ровные овальные (6 × 14 мкм) отверстия, обнаруженные на нитчатом фрагменте ископаемого неясного систематического положения из разреза Олемекен (рис. 3и). Из-за отсутствия других экземпляров не ясно, является вытянутая форма отверстий первичной или обусловлена деформацией филлента.

В третью группу выделяются отверстия заметно меньших размеров — 0.5–1.0 мкм в диаметре, встреченные на одном экземпляре *Leiosphaeridia* sp. (рис. 4а–4в) и на одной сильно вытянутой форме, представленной плотной оболочкой без складок (рис. 4г, 4д) из разреза Олемекен. Если на последней форме равномерно расположенные отверстия могут создавать впечатление первичного орнамента оболочки, то на *Leiosphaeridia* отчетливо заметны неперфорированные участки (рис. 4б), что говорит в пользу того, что отверстия

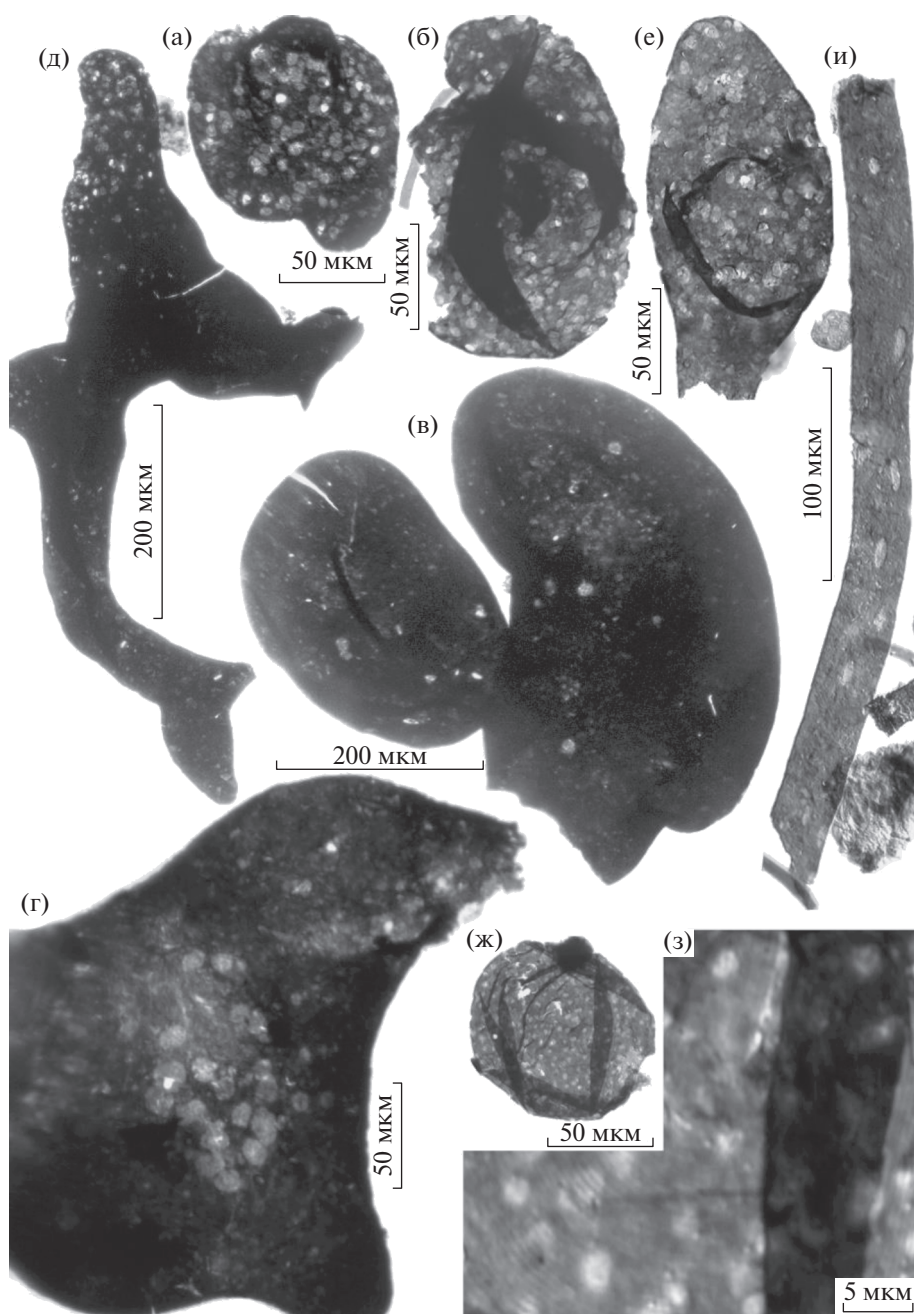


Рис. 3. Перфорированные микрофоссилии из лахандинского лагерштетта: а–г – *Majasphaeridium carpogenum*, д – *Majaphyton antiquum*; е, и – формы неясного систематического положения; ж, з – *Valeria lophostriata*: ж – общий вид, з – увеличенный участок оболочки со стриа́тной структурой; колл. ЦКП “Геохрон” ИНГГ СО РАН, № 2102: а – экз. № 398/24, б – экз. № 395/6, в – экз. № 398/25, г – экз. № 399/8, д – экз. № 398/2, е – экз. № 395/5, ж – экз. № 396/14, з – экз. № 405/20.

являются повреждениями первично гладкой оболочки.

Все описываемые структуры отличаются от разнообразных повреждений зернами породы, выдержанностью формы и размера, а от полигональных отверстий, связанных с повреждениями оболочек кубическими кристаллами пирита, – ровными округлыми очертаниями и отсутствием

приподнятой кромки. Таким образом, отверстия, встреченные на ископаемых различной таксономической принадлежности, с большой вероятностью являются вторичными структурами, однако не являются результатом механического повреждения зернами осадка или кристаллами, а могли быть нанесены гетеротрофными организмами, с целью добычи питательных веществ.

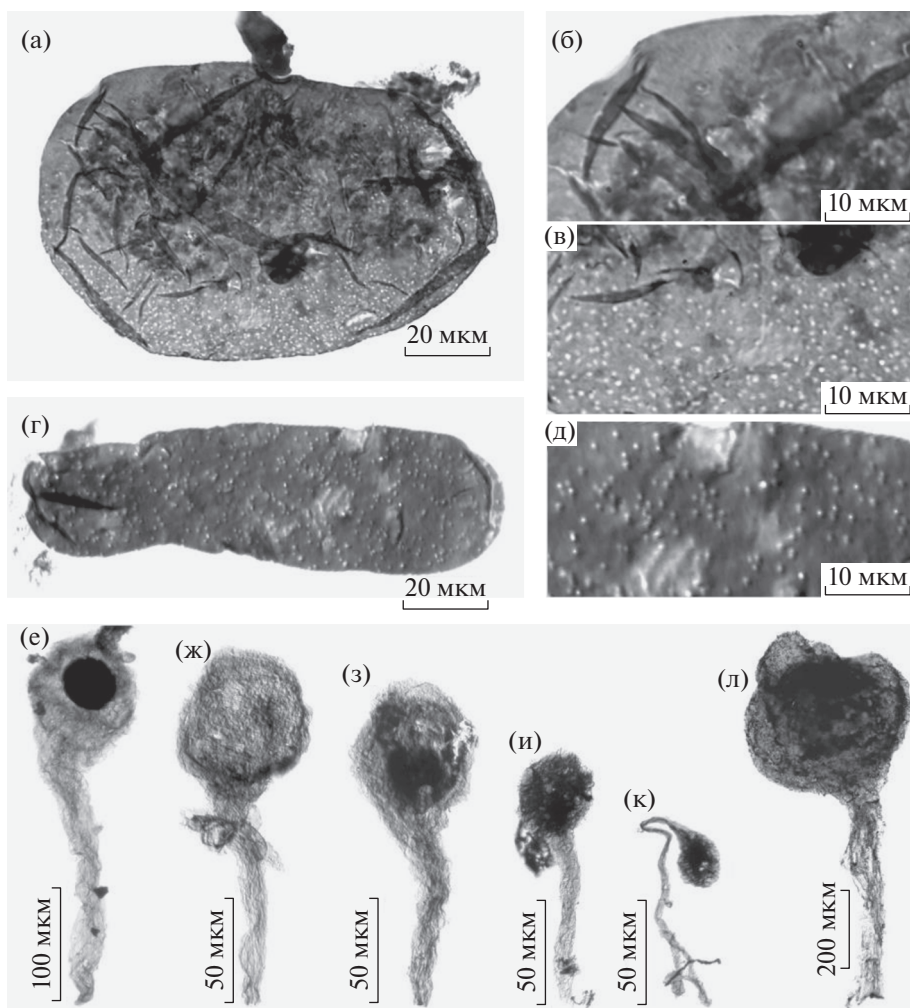


Рис. 4. Ископаемые остатки неясного систематического положения и возможные прорастающие споры грибоподобных организмов из лахандинского лагерштетта: а–в – следы повреждений на гладкостенной сферической форме; г, д – равномерно расположенные отверстия, возможно являющиеся оригинальной структурой стенки организма; е–к – *Germinosphaera* sp.; л – *Caudosphaera expansa* Hermann et Timofeev, 1989; а–к – колл. ЦКП “Геохрон” ИНГГ СО РАН, № 2102: а–в – экз. № 404/19, г, д – экз. № 405/21, е – экз. № 396/8, ж – экз. № 405/1, з – экз. № 406/16, и – экз. № 396/15, к – экз. № 395/8, л – экз. ПИН, № 5805/3001.

Интерпретация схожих перфораций на органостенных эукариотах обсуждалась ранее по находкам из серии Академикербрен (возраст 750 млн лет), Шпицберген [5], серии Чуар (780–740 млн лет), США [6] и серии Шалер (1150–900 млн лет), Арктическая Канада [7]. Круглые и крупные (до 50 мкм в диаметре) отверстия на оболочке *Leiosphaeridia* sp. со Шпицбергена были интерпретированы как следы деградации органического вещества колониями бактерий, а мелкие (2–3 мкм в диаметре) – могли быть оставлены каким-то хищником или индивидуальным редуцентом [5]. С. Портер на основании близости формы и размеров перфораций полагает, что нерегулярные отверстия диаметром 0.1–3.4 мкм, описанные у нескольких ископаемых таксонов из неопротерозоя США, могли быть оставлены хищными про-

тистами, подобными современным амебам вампиреллам [6]. Такой же интерпретации придерживается и К. Лорон, описывая отверстия диаметром 0.1–7.1 мкм на оболочках нескольких эукариотических форм из серии Шалер [7]. Автор делает акцент на хищнической природе предполагаемых сверлильщиков – протистов и указывает, что перфорация отмечена только на представителях эукариот, что, по его мнению, свидетельствует об избирательной стратегии предполагаемых хищников. В свою очередь, направленное хищничество, по гипотезе Лорона, стало одним из важных факторов диверсификации эукариот в позднем протерозое [7].

Однако характер перфорации не только не позволяет судить о пищевой стратегии предполагаемых гетеротрофов, но даже о том, были ли эти

повреждения выполнены прокариотами или эукариотами. Если остатки амёб известны из тех же отложений, что и перфорированные фоссилии из серии Чуар, то никаких прямых свидетельств их сосуществования с более древней биотой Шалер нет. В то же время из отложений серии Шалер [8] описаны остатки предполагаемых низших грибов, представленные спорангиями, прикрепленными к ветвящимся гифам толщиной 3–5 мкм, а также возможные прорастающие споры зооспоровых организмов – *Germinosphaera bispinosa* (Mikhailova, 1986) Butterfield et al., 1994, известные также из отложений серии Академикербрен [5].

Представители рода *Germinosphaera* обычны в образцах кумахинской и нельканской свит лахандинской серии, где они представлены одиночными сферическими клетками диаметром от 25 до 100 мкм с длинными нитчатыми выростами от 4 мкм до 30 мкм шириной (рис. 4е–4к), напоминающие прорастающие споры зооспоровых организмов. Здесь же часто встречаются представители вида *Caudosphaera expansa* Hermann et Timofeev, 1989 – крупные одиночные сферические клетки диаметром 200–500 мкм с одиночным хвостовидным выростом, разделенным на нити шириной 4–8 мкм (рис. 4л), вероятно, являющиеся спорангиями зооспоровых грибов.

Грибоподобные формы, но только с заметно меньшей толщиной гиф (~1 мкм), обнаружены нами в нельканской свите лахандинской серии, в тех же образцах, что и перфорированные остатки. Как отмечалось выше, они сочетают признаки как хитридиевых грибов, так и пероноспорицет, представляя собой овальные до круглых клетки-спорангии с характерным уплотнением в основании, прикрепленные к ризоидам через вырост, содержащий септу. Знаменательно, что один из спорангиев, обнаруженных в нельканской свите, заполнен многочисленными круглыми мелкими клетками – спорами, диаметром 2 мкм. По аналогии с зооспорангиями современных низших грибов и пероноспорицетов, после выхода из спорангия зооспора, вероятно, прорастала новыми гифами.

Помимо описанных ископаемых остатков из лахандинского лагерштетта выделены фрагменты гиф толщиной 20–30 мкм, несущие зооспорангии на разных стадиях развития и напоминающие современные пероноспорицеты. Хитридиевые и пероноспорицеты относятся к зооспоровым грибам – сборной группе протистов с осмотрфным типом питания, как правило, обладающих талломом с клеточной стенкой [9]. Современные хитридиевые и пероноспорицеты выполняют роль сапротрофов либо паразитов различных групп организмов, включая другие зооспоровые грибы, растения и животные. В зависимости от группы, таллом развит в разной степени, порой

образуя густую сеть гиф [10, 11], прорастающих через клеточные стенки как мертвых, так и живых организмов, повреждая их. Зооспоры хитридиевых и пероноспорицет также используют органику в качестве питательного субстрата, проникая через стенки клеток [12]. Размер повреждений, очевидно, зависит от участка гифы, непосредственно проникающего через клеточную стенку. У прорастающих зооспор он может быть существенно меньше диаметра основной гифы и достигать 0.1–0.2 мкм [13]. Диаметр гиф у пероноспорицет варьирует от 2 мкм до 150 мкм [9]. У некоторых представителей современных хитридиевых диаметр гиф может существенно изменяться: от 5 мкм у основания спорангия до 1 мкм на кончиках ризоидов [14]. Также известно, что одиночные бактерии способны производить отверстия диаметром менее 1 мкм [15]. Таким образом, размер перфораций, встреченных на ископаемых остатках из серий Академикербрен, Чуар и Шалер, а также из лахандинского лагерштетта, сопоставим с диаметрами вегетативных частей зооспоровых грибов и бактерий.

Необходимо отметить следующие важные результаты проделанного исследования. Надежно датированный лахандинский лагерштетт содержит одну из самых древних биот со следами пищевых цепей, в которые были вовлечены эукариоты. Установлено, что перфорации, описанные на ископаемых эукариотах *Majasphaeridium carpogenum*, *Majaphyton antiquum*, *Valeria lophostriata*, а также на ряде остатков неясного систематического положения из лахандинского лагерштетта, не являются первичными элементами их морфологии. Показано, что они могли быть выполнены как прокариотами, так и эукариотами – зооспоровыми грибами, встреченными в этих же отложениях. Характер перфораций, к сожалению, не позволяет определить, были ли организмы атакованы при жизни или повреждены после смерти. Разнообразный таксономический состав “жертв”, а также отсутствие каких-либо особенностей морфологии перфораций не позволяет говорить об однозначно эукариотической природе сверлильщиков, и, следовательно, о том, что в рифее уже оформилось устойчивое избирательное хищничество среди протистов. Таким образом, одна из центральных гипотез причин взрывной диверсификации эукариот в позднем протерозое [7] на данный момент не находит палеонтологического подтверждения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования поддержаны РФФИ (грант № 17-54-12077).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семихатов М.А., Серебряков С.Н. Сибирский гипостратотип рифея. М.: Наука, 1983. 222 с.
2. Овчинникова Г.В., Семихатов М.А., Васильева И.М. и др. Pb-Pb возраст известняков среднерифейской малгинской свиты, Учуро-Майский регион Восточной Сибири // Стратиграфия. Геологическая корреляция. 2001. Т. 9. № 6. С. 3–16.
3. Rainbird R.H., Stern R.A., Khudoley A.K. et al. U-Pb geochronology of Riphean sandstone and gabbro from southeast Siberia and its bearing on the Laurentia-Siberia connection // Earth and Planetary Science Letters. 1998. V. 164. P. 409–420. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(98\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(98)00222-2)
4. Семихатов М.А., Овчинникова Г.В., Горохов И.М. и др. Изотопный возраст границы среднего и верхнего рифея: Pb-Pb-геохронология карбонатных пород лахандинской серии, восточная Сибирь // Доклады Академии наук. 2000. Т. 372. № 2. С. 216–221.
5. Butterfield N.J., Knoll A.H., Swett K. Paleobiology of the Neoproterozoic Svanbergfjellet Formation, Spitsbergen // Fossils and Strata. 1994. № 34. P. 1–84. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1994.tb01558.x>
6. Porter S.M. Tiny vampires in ancient seas: evidence for predation via perforation in fossils from the 780–740 million-year-old Chuar Group, Grand Canyon, USA // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2016. V. 283. P. 1–6. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0221>
7. Loron C.C., Rainbird R.H., Turner E.C. et al. Implications of selective predation on the macroevolution of eukaryotes: evidence from Arctic Canada // Emerging Topics in Life Sciences. 2018. V. 2. P. 247–255. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170153>
8. Loron C.C., Rainbird R.H., Turner E.C. et al. Organic-walled microfossils from the late Mesoproterozoic to early Neoproterozoic lower Shaler Supergroup (Arctic Canada): Diversity and biostratigraphic significance // Precambrian Researches. 2019. V. 321. P. 349–374. <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2018.12.024>
9. Beakes G.W., Thines M. Hyphochytriomycota and Oomycota // Handbook of the Protists. Cham: Springer Intern. Publ., 2017. P. 435–505.
10. Karling J.S. Zoospore Fungi of Oceania. II. Two saprophytic species of Aphanomyces // Mycology. 1968. V. 60. P. 271–284. <https://doi.org/10.1080/00275514.1968.12018568>
11. Sparrow F.K. Aquatic Phycomycetes, 2 ed. Ann Arbor: Univ. Michigan Press, 1960. P. i–xxv, 1–1187.
12. Abeliovich A., Dikbuck S. Factors Affecting Infection of Scenedesmus obliquus by a Chytridium sp. in Sewage Oxidation Ponds // Applied and Environmental Microbiology. 1977. V. 34. P. 832–836. <https://doi.org/10.1128/aem.34.6.832-836.1977>
13. Dick M.W. The Peronosporomycetes and other flagellate fungi // Pathogenic fungi in humans and animals, 2 ed. Basel: Marcel Dekker Inc., 2003. 17–68.
14. Goldstein S. Physiology of aquatic fungi. I. Nutrition of two monocentric chytrids // Journal of Bacteriology. 1960. V. 80 P. 701–707. <https://doi.org/10.1128/JB.80.5.701-707.1960>
15. Old K.M., Wong J.N.F. Perforation and lysis of fungal spores in natural soils // Soil Biology and Biochemistry. 1976. V. 8. P. 285–292. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90058-4)

EVIDENCES OF THE OLDEST TROPHIC INTERACTIONS IN THE RIPHEAN BIOTA (LAKHANDA LAGERSTÄTTE, SOUTHEASTERN SIBERIA)

J. V. Shuvalova^{a,b,#}, K. E. Nagovitsin^{c,d}, and P. Yu. Parkhaev^a^a Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation^b Swinburne University of Technology, Hawthorn, Australia^c Trofimuk Institute of Petroleum Geology and Geophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation^d Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation[#]e-mail: pinmuse@gmail.com

Presented by academician of the RAS A.V. Lopatin

Evidences of perforation of organic-walled fossil eukaryotes by other organisms have been found in the Lakhanda Lagerstätte (1030–1000 Ma, southeastern Siberia). The type of perforation is most similar to the type described from the Akademikerbeen (750 Ma, Spitsbergen), Chuar (780–740 Ma, USA) and Shaler Supergroups (1150–900 Ma, Arctic Canada). The biogenic origin of the perforations has been substantiated. A hypothesis of the perforation of the fossils by zoospore fungi found in the same deposits is proposed. At the same time, the taxonomic variety of the eukaryotic “prey” taxa and the primitive morphology of such perforations does not allow us to qualify the perforators as distinct protists and does not point absolute certainty out to the specific predator among eukaryotes during the Riphean (Mesoproterozoic). Thus, the hypothesis of the explosive diversification of eukaryotes in the Late Proterozoic driven by selective predation cannot yet be confirmed paleontologically.

Keywords: Lakhanda Lagerstätte, Riphean, Proterozoics, perforation, predation

УДК 577.218

ХЕЛИКАЗА MLE – НОВЫЙ УЧАСТНИК РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *ftz-f1*, КОДИРУЮЩЕГО ЯДЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР У ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

© 2021 г. Ю. В. Николенко^{1,*}, М. М. Куршакова¹,
А. Н. Краснов¹, член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹

Поступило 03.09.2020 г.
После доработки 08.09.2020 г.
Принято к публикации 08.09.2020 г.

Хеликаза MLE является эволюционно-консервативным белком эукариот, участвующим в широком спектре процессов регуляции экспрессии генов. Ранее мы изучали свойства MLE на модели *Drosophila melanogaster*. В настоящей работе продолжено изучение функций MLE и показано, что MLE взаимодействует с компонентами комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин. Для понимания работы MLE был проанализирован профиль связывания MLE с регуляторными элементами SWI/SNF-зависимого гена *ftz-f1* и исследовано влияние MLE на экспрессию этого гена, транскрипция которого происходит по механизму “задержки” РНК-полимеразы II. Полученные данные указывают на важную роль MLE в обеспечении своевременной активации и высокого уровня экспрессии гена *ftz-f1 in vivo*.

Ключевые слова: MLE, DHX9, SWI/SNF, *ftz-f1*, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S2686738921010182

Хеликаза MLE (Maleless) *D. melanogaster* и ее ортологи у других организмов, объединяемые под общим названием DHX9, относятся к семейству хеликаз, содержащих консервативный мотив DEXH-бок. Как было показано *in vitro*, DHX9 способна связывать и расплетать двуцепочечные ДНК, РНК, а также РНК-ДНК-гибриды и другие сложные структуры, образующиеся в ядре эукариотической клетки в процессах репликации, рекомбинации и транскрипции [1].

Для DHX9 человека показано участие в широком спектре процессов регуляции экспрессии генов. У *D. melanogaster* подробно изучена роль MLE как компонента комплекса дозовой компенсации у самцов [2], однако у других организмов, в частности нематоды и человека, дозовая компенсация достигается по совершенно другим механизмам, в которых DHX9 не участвует.

Хотя у *D. melanogaster* на протяжении длительного времени MLE изучалась почти исключительно как компонент комплекса дозовой компенсации, в ряде исследований были описаны и дополнительные функции MLE, схожие с функ-

циями DHX9 у других организмов. Было показано, что MLE участвует в сплайсинге, в процессинге мРНК, в РНК-интерференции, взаимодействует с комплексом ремоделирования хроматина NURD и регулирует транскрипцию генов гетерохроматина [3–5]. В нашей предыдущей работе было обнаружено взаимодействие MLE с белком ENY2, консервативное у *D. melanogaster* и человека [6, 7]. ENY2 – консервативный ядерный белок, который физически взаимодействует с рядом мультибелковых комплексов, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов, в том числе, с ремоделирующим хроматин комплексом SWI/SNF [8].

В настоящей работе было продолжено изучение функций MLE. Были исследованы взаимодействие MLE с комплексом SWI/SNF и участие MLE в SWI/SNF-зависимой транскрипции. Мы провели реакцию иммунопреципитации белков из ядерного эмбрионального экстракта и ядерного экстракта из клеток линии Schneider2 (S2) и обнаружили, что антитела к MLE эффективно копреципитируют субъединицы комплекса SWI/SNF, включая каталитическую субъединицу Brahma (рис. 1a). Таким образом, было показано, что MLE физически взаимодействует с компонентами комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF.

Затем был исследован вопрос об участии MLE в SWI/SNF-зависимой регуляции экспрессии генов. Ранее были подробно исследованы регуля-

¹ Федеральное государственное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

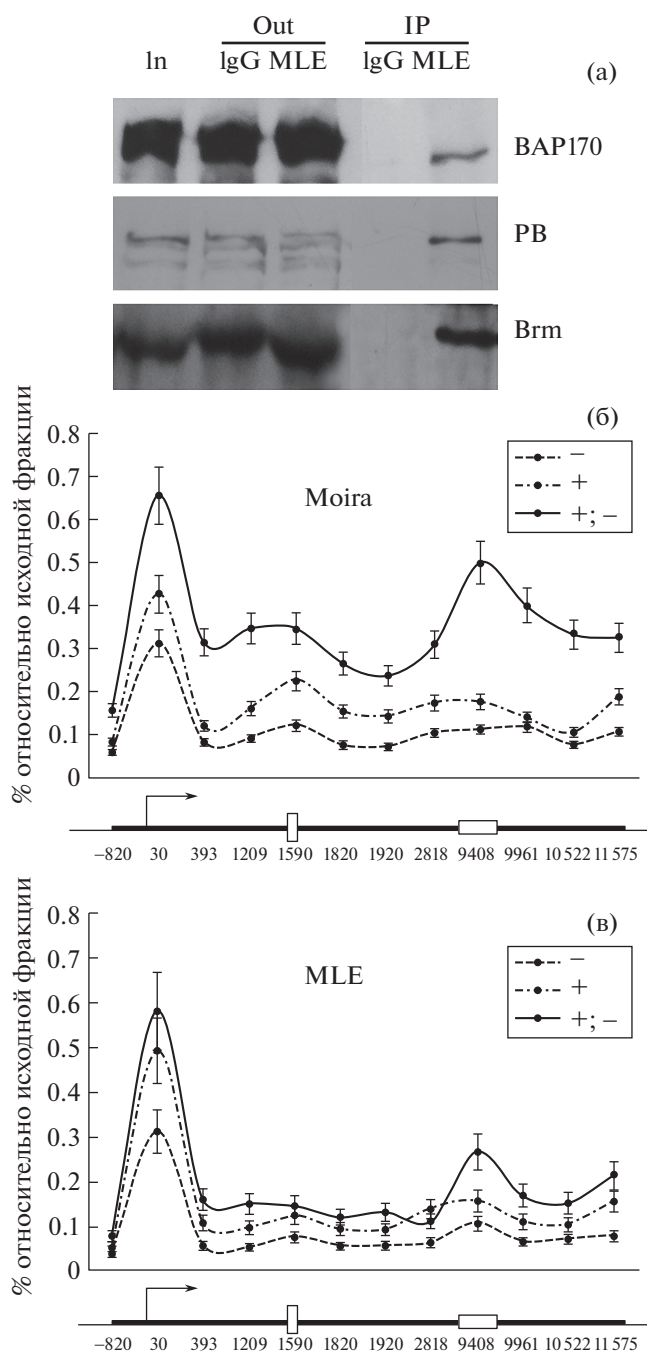


Рис. 1. Коиммунопреципитация MLE и компонентов комплекса SWI/SNF (а) и профили связывания SWI/SNF и MLE с промотор-проксимальной областью гена *ftz-f1* (б и в соответственно). IP – иммунопреципитация, In – исходная фракция эмбрионального ядерного экстракта, Out – фракция эмбрионального ядерного экстракта после инкубации с антителами, IgG – преиммунная сыворотка, которая служит контролем иммунопреципитации. PB (Polybromo), Brm (Brahma), VAP170, Moira – субъединицы комплекса SWI/SNF. По горизонтальной оси отмечено расстояние относительно старта транскрипции гена *ftz-f1*, п.н. Стрелкой обозначен старт транскрипции гена, вертикальным прямоугольником – район “задержки” РНК-полимеразы II, горизонтальным прямоугольником – энхансер.

ция транскрипции гена экдизонового каскада *ftz-f1* и регуляторные области в промотор-проксимальной части этого гена. Ген *ftz-f1* кодирует ядерный рецептор, консервативный у высших эукариот. Активация транскрипции гена *ftz-f1* у *D. melanogaster* происходит по механизму “задержки” РНК-полимеразы II и включает так называемую “подготовительную” стадию, адекватное протекание которой обеспечивает высокий уровень транскрипции на последующей стадии активной транскрипции [9,10]. Кроме того, на уровень транскрипции гена *ftz-f1* оказывает влияние энхансер, расположенный в дистальной части первого интрона [11]. В этих процессах играет важную роль комплекс SWI/SNF, пики связывания которого находятся на ключевых регуляторных сайтах – промоторе, сайте “задержки” РНК-полимеразы II и интронном энхансере [9,12].

В настоящей работе для изучения роли MLE в регуляции экспрессии гена *ftz-f1* была использована ранее разработанная модельная система [9], позволяющая активировать экдизоновый каскад в клетках S2 и детально исследовать ген *ftz-f1* на разных стадиях его активации. В отсутствие экдизона в культуральной среде ген *ftz-f1* был практически не активен (стадия “-”). После добавления экдизона и последующей инкубации в течение ночи ген находился на подготовительной стадии (стадия “+”). На этой стадии РНК-полимераза II начинает осуществлять транскрипцию, но останавливается на расстоянии ~1.5 т.п.н. от промотора. После отмывки клеток и инкубации в течение 3 часов в среде без экдизона ген *ftz-f1* вступал в стадию активной транскрипции (стадия “+; -”).

Методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) было исследовано связывание MLE с промотор-проксимальной областью гена *ftz-f1* на всех стадиях его транскрипции (рис. 1в). Оказалось, что профиль связывания MLE очень похож на профиль связывания комплекса SWI/SNF [9,12]; для наглядности на рис. 1б представлен профиль связывания Moira – одной из коровых субъединиц комплекса SWI/SNF. MLE, также как SWI/SNF, сильнее всего связан с промотором и энхансером гена, и его связывание усиливается в процессе активации транскрипции.

Следующий вопрос, который мы исследовали – оказывает ли MLE влияние на уровень транскрипции гена *ftz-f1* в данной модельной системе. Для решения этого вопроса был сделан нокдаун MLE методом РНК-интерференции. Результаты эксперимента представлены на рис. 2а. Для измерения уровня транскрипции мы использовали метод ОТ-ПЦР в реальном времени и праймеры, расположенные на расстоянии 1900 п.н. от промотора, т.е. “ниже” сайта “задержки” РНК-полимеразы II, чтобы детектировать только полно-размерные транскрипты. На первых двух стадиях

в модельной системе на фоне снижения содержания MLE уровень транскрипции гена *ftz-f1* повышался. Наиболее заметно (в 3 раза) — на подготовительной стадии транскрипции, для которой ранее было показано особо значимое влияние комплекса SWI/SNF [9, 12].

Нарушение связывания комплекса SWI/SNF с регуляторными последовательностями гена *ftz-f1* *in vivo* приводит к тому, что в процессе метаморфоза *ftz-f1* начинает экспрессироваться преждевременно, но его транскрипция остается на низком уровне [9]. Мы исследовали влияние мутации в гене *mle* на транскрипцию гена *ftz-f1* в начале метаморфоза. Чтобы исключить влияние комплекса дозовой компенсации, в эксперименте были использованы только личинки и предкуколки женского пола. Были отобраны самки с генотипом *mle* [9]/*mle* [9] (мутация, приводящая к потере функции белка) и самки дикого типа трех возрастных категорий в начале метаморфоза. Чтобы точно определить возраст личинок поздней третьей стадии, использовали метод, основанный на том, что перед началом метаморфоза личинки перестают питаться, и их пищеварительная система освобождается от съеденного ранее корма [13]. Личинок культивировали в стандартных условиях при температуре 25°C с добавлением в корм 0.05% бромфенолового синего. На пятый день развития визуально оценивали наличие синего красителя в пищеварительной системе личинок. Питающиеся личинки были отобраны, как имеющие возраст >8 ч до формирования предкуколки (ДФП), возраст личинок без бромфенолового синего в пищеварительной системе был определен как 2–6 ч ДФП. Третья группа особей — белые предкуколки в течение первого часа после формирования — 0 ч. Результаты представлены на рис. 2б. Как и в предыдущем эксперименте, мы детектировали только полноразмерные транскрипты гена *ftz-f1*. За 8 ч ДФП ген *ftz-f1* транскрибируется на одинаково низком уровне как в мутантах *mle* [9], так и в контрольных личинках. За 6–2 ч ДФП уровень транскрипции возрастает в 3 раза в личинках дикого типа, и в 2 раза в личинках *mle* [9]. Наконец, сразу после формирования предкуколки уровень транскрипции быстро возрастает в норме и наоборот несколько снижается в мутантах.

Итак, в настоящей работе было показано, что MLE совместно с комплексом SWI/SNF связывается с регуляторными элементами гена *ftz-f1* и влияет на его транскрипцию в модельной системе и *in vivo*. Мы полагаем, что MLE в процессе экспрессии данного гена выполняет функцию расплетания сложных структур, которые образуются в процессе транскрипции по механизму “задержки” РНК-полимеразы II, а также при формировании петли между промотором и энхансером и одновременном прохождении транскрипции.

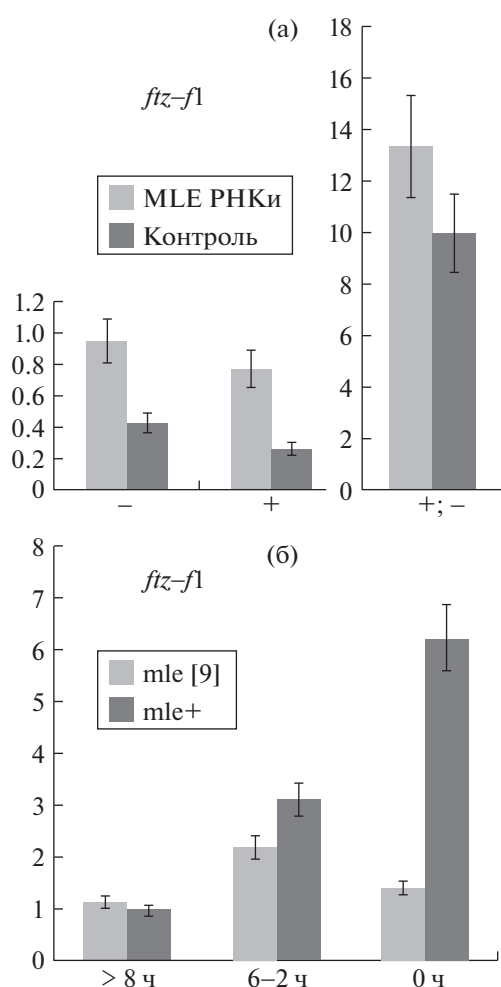


Рис. 2. Изменение уровня транскрипции гена *ftz-f1* на фоне РНК-интерференции MLE в модельной системе в клетках S2 (а) и на фоне мутации *mle* [9] *in vivo* в личинках и предкуколках женского пола (б). Все эксперименты были проведены в трех биологических повторностях. Уровень транскрипции гена *ftz-f1* был измерен относительно уровня транскрипции контрольного гена *ras*.

ДНХ9 человека является потенциальной мишенью для терапии, поскольку она вовлечена в репликацию и транскрипцию ряда РНК-содержащих вирусов, и в то же время в иммунный ответ организма на вирусную инфекцию и в злокачественную трансформацию [1, 14, 15]. Конкретная роль и механизмы работы ДНХ9 в перечисленных процессах требуют дальнейшего изучения. Поэтому мы считаем важным изучение “универсальных”, потенциально консервативных в эволюции функций MLE вне комплекса дозовой компенсации. Данная работа вносит вклад в эту область знаний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты ПЦР в реальном времени были выполнены на приборе ЦКП ИБГ РАН. Авторы благо-

дарны Н.Е. Воробьевой за предоставленные антитела к субъединицам комплекса SWI/SNF.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 18–04–01019.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee T., Pelletier J. // *Oncotarget*. 2016. V. 7 (27). P. 42716–42739.
2. Morra R., Yokoyama R., Ling H., et al. // *Epigenet. Chromatin*. 2011. V. 4 (6).
3. Reenan R.A., Hanrahan C.J., Ganetzky B. // *Neuron*. 2000. V. 25. P. 139–149.
4. Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H., et al. // *Mol Cell Proteomics*. 2015. V. 14. № 6. P. 1478–1488.
5. Cugusi S., Li Y., Jin P., et al. // *PLoS Genet*. 2016. V. 12 (1).
6. Nikolenko J.V., Kurshakova M.M., Krasnov A.N. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2019. V. 489. P. 407–410.
7. Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., et al. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481.
8. Gurskii D.Ia., Orlova A.V., Kopytova D.V., et al. // *Genetika*. 2010. V. 46 (12) P. 1700–1703.
9. Vorobyeva N., Nikolenko J., Nabirochkina E., et al. // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. P. 7319–7331.
10. Vorob'eva N.E. // *Tsitologiya*. 2013. V. 55. № 3. P. 153–158.
11. Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Mazina M.Y. et al. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2017. V. 474. № 1. P. 236–238.
12. Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // *Russian Journal of Genetics*. 2019. V. 55. № 2. P. 163–171.
13. Andres A.J., Thummel C.S. // *Methods Cell Biol*. 1994. V. 44. P. 565–73.
14. Boeras I., Song Z., Moran A., et al. // *J. Mol. Biol*. 2016. V. 428. № 11. P. 2418–2429.
15. Fidaleo M., De Paola E., Paronetto M.P. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 19. P. 28711–28723.

MLE HELICASE IS A NEW PARTICIPANT IN THE TRANSCRIPTION REGULATION OF THE *ftz-f1* GENE ENCODING A NUCLEAR RECEPTOR IN HIGHER EUKARYOTES

J. V. Nikolenko^{a,#}, M. M. Kurshakova^a, A. N. Krasnov^a,
and Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva^a

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

MLE helicase is an evolutionarily conserved eukaryotic protein involved in a wide range of processes in the regulation of gene expression. Previously, we studied the properties of MLE on the *Drosophila melanogaster* model. In the present work we continue studying the functions of MLE and show that MLE interacts with the components of the SWI/SNF chromatin remodelling complex. To clarify the work of MLE, the profile of MLE binding to the regulatory elements of the SWI/SNF-dependent *ftz-f1* gene was analyzed. The effect of MLE on the expression of this gene, the transcription of which occurs by the RNA polymerase II pausing mechanism, was investigated. The data obtained indicate the important role of MLE in ensuring timely activation and high level of expression of the *ftz-f1* gene *in vivo*.

Keywords: MLE, DHX9, SWI/SNF, *ftz-f1*, gene expression

УДК 576.5, 57.085.2

ИММОРТАЛИЗАЦИЯ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ

© 2021 г. А. К. Бейлин^{1,2}, Н. Г. Гурская^{1,2}, Н. А. Евтушенко², Е. В. Алпеева¹, А. В. Косых^{1,2},
В. В. Терских¹, член-корреспондент РАН А. В. Васильев^{1,3}, член-корреспондент РАН Е. А. Воротеляк^{1,2,3*}

Поступило 02.09.2020 г.
После доработки 07.09.2020 г.
Принято к публикации 08.09.2020 г.

Путем трансформации первичных кератиноцитов человека с помощью hTERT получена новая стабильная клеточная линия. Клетки обладают видоизмененной морфологией, аномальным хромосомным составом и экспрессией маркеров кератиноцитов, не проявляют контактного торможения и способны к росту на различных культуральных средах, в условиях культивирования обладают ограниченной стратификацией. При трансплантации иммунодефицитным мышам полученная клеточная линия формирует опухоли.

Ключевые слова: кератиноциты человека, теломераза, трансдукция, трансформация, иммортализация, клеточная культура, кожный эквивалент, иммунодефицитные мыши, опухоленность

DOI: 10.31857/S2686738921010042

Основными контролерами клеточного старения являются теломеры — участки концов хромосом, которые в первичных соматических клетках постепенно укорачиваются с каждым раундом деления. В половых и некоторых соматических стволовых клетках активен рибонуклеиновый комплекс — теломераза, каталитическая субъединица которого (hTERT) синтезирует теломерные повторы и проявляет свои функции, будучи гетерологически экспрессирована в клетках разных типов [1]. Однако эктопической экспрессии одной hTERT не достаточно для иммортализации кератиноцитов, которые требуют активации циклин-зависимых киназ для прохождения контрольных точек в митотическом цикле [2, 3]. В связи с этим исследователям доступно всего не-

сколько линий спонтанно иммортализовавшихся кератиноцитов: NM1, HaCaT, NIKS [4, 5]. Ранее было показано, что экспрессия в первичных кератиноцитах кДНК hTERT может привести к получению стабильных линий клеток [4], по-видимому, за счет дополнительной спонтанной трансформации.

В данной работе мы провели трансформацию первичных кератиноцитов человека с помощью hTERT, в результате чего была получена стабильная клеточная линия. Целью последующей работы стало изучение свойств полученных клеток.

Выделение и культивирование первичных кератиноцитов были описаны ранее [6]. Иммортализация производилась с помощью трансдукции лентивирусным вектором, несущим кДНК hTERT. Отбор иммортализованных клеток осуществлялся с помощью селекции по устойчивости к пуromицину.

Был произведен цитогенетический анализ клеток методом G-дифференциального окрашивания.

Активность теломеразы была оценена с помощью кита TRAPEZE (S7710) в соответствии с указаниями производителя.

Фазово-контрастную микроскопию клеточных культур осуществляли на микроскопе EVOS FL AUTO.

Трансплантация клеток в семенники иммунодефицитных мышей осуществлялась по стандартному протоколу в условиях SPF-вивария [7].

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: vorotelyak@yandex.ru

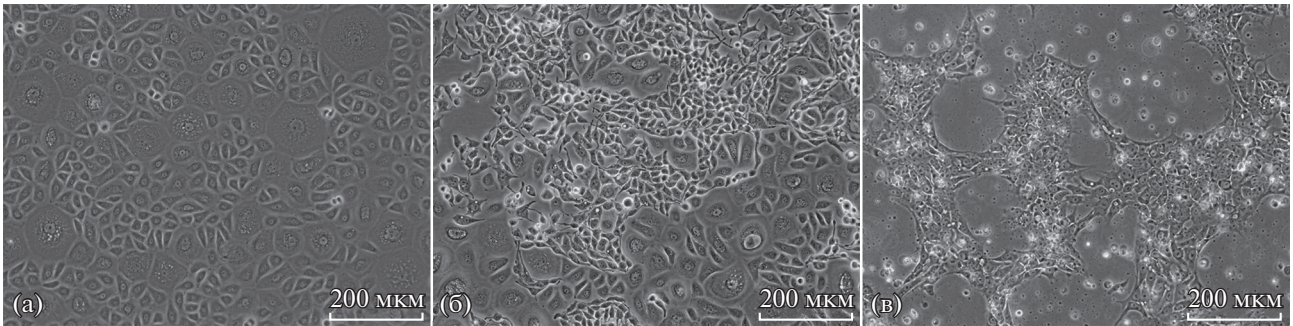


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия. Увеличение $\times 200$. (а) культура первичных кератиноцитов; (б) появление трансформированных кератиноцитов после процедуры immortalизации, среда SpT-07; (в) трансформированные кератиноциты, среда DMEM/F12 с 10% сыворотки.

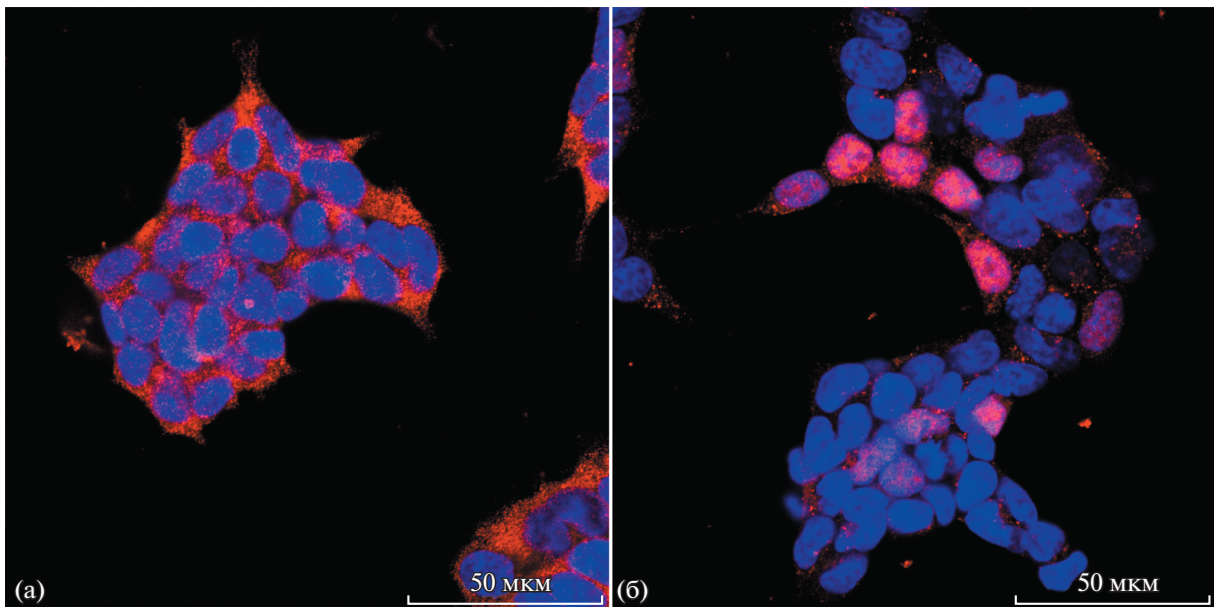


Рис. 2. Культура трансформированных кератиноцитов. Иммунофлуоресцентное окрашивание. Конфокальная микроскопия. Синий – ДНК (DAPI). Красный – кератин 14 (а), теломераза (б).

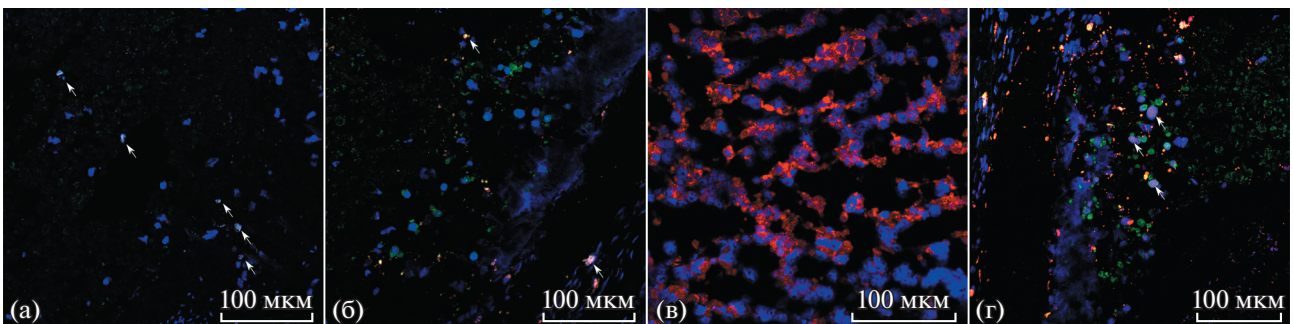


Рис. 3. Срез семенника мыши после трансплантации в него трансформированных кератиноцитов. Конфокальная микроскопия. Синий – ДНК (DAPI). Зеленый – человеческие ядра. Красный – кератин 14 (а), кератин 10 (б), лорикрин (в), теломераза (г). Белые стрелки указывают на клетки с тройным окрашиванием.

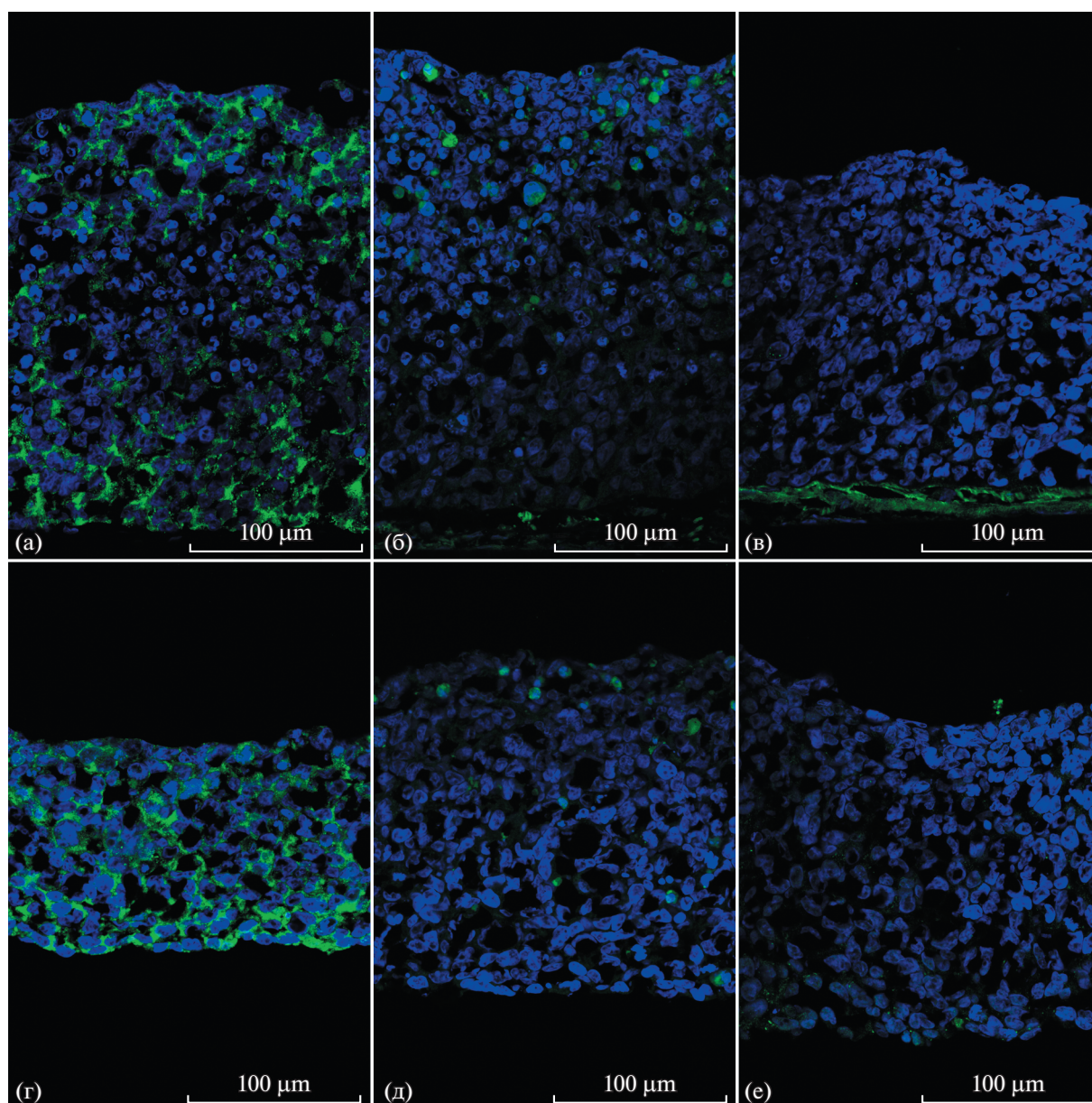


Рис. 4. Срезы кожных эквивалентов, полученных из трансформированных кератиноцитов и первичных дермальных фибробластов человека. Конфокальная микроскопия. а, б, в – среда DMEM/F12 для стратификации. г, д, е – среда CnT-Prime Airlift. Синий – ДНК (DAPI). Зеленый – кератин 14 (а, г), кератин 10 (б, д), коллаген 7 (в, е).

Создание кожных эквивалентов и изготовление криосрезов осуществляли по ранее описанной методике [6]. В одной из групп вместо культуральной среды CnT-Prime Airlift (Ztn-Bio, США) использовали DMEM/F12 с 10% сыворотки и добавлением ITS (Insulin-Transferrin-Selenium, добавка инсулин-трансферрин-селен) и EGF (Epidermal Growth Factor, рекомбинантный эпидермальный фактор роста человека) (Gibco, США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеточных культур и криосрезов осуществлялось по методике, описанной ранее [8].

Конфокальную съемку производили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 880 на базе Axio Observer.Z1.

Культура первичных кератиноцитов перед процедурой immortalization имела типичную для кератиноцитов морфологию “булыжной мостовой” (рис. 1а). После лентивирусной трансдукции и селективного отбора в среде с антибиотиком в культуре появилась популяция клеток с измененной морфологией, они были меньше в диаметре, имели округлую форму и формировали небольшое число крупных отростков (рис. 1б).

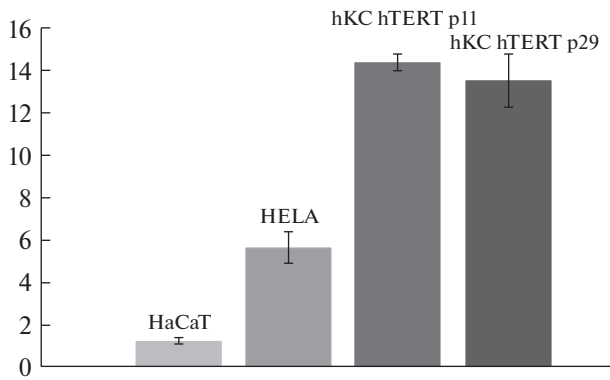


Рис. 5. Результаты теста TRAPeze. hKC hTERT – иммортализованные кератиноциты человека. В отрицательном контроле (первичные кератиноциты) активность теломеразы ниже порога чувствительности теста. По оси ординат – активность теломеразы (амоль/мг белка/мин).

После образования монослоя клетки демонстрировали отсутствие контактного торможения. После нескольких пассажей данные клетки полностью вытеснили другие кератиноциты, образовав морфологически гомогенную популяцию, сохраняющуюся на протяжении более 20 пассажей. В среде DMEM/F12 с сывороткой, содержащей более высокую концентрацию ионов кальция, чем среда СпТ-07, используемая на первых этапах работы, произошло изменение морфологии и особенностей роста: клетки стали более распластанными, при этом, несмотря на продолжающийся рост, не образовывали монослоя, оставляя промежутки между островками клеток, соединенными перешейками, а также обладали пониженной адгезией к пластику (рис. 1в).

В результате цитогенетического исследования в 100% клеток выявлен гипердиплоидный набор хромосом (модальное число хромосом 55–69) с множественными хромосомными аномалиями: дубликацией участков р31–р32, р12–р36, q25–q44 1-й хромосомы, делеции участков q23–qter длинного плеча 3-й хромосомы и q31–qter длинного плеча 7-й хромосомы, дополнительные материалы неизвестного происхождения на р-плече 4-й хромосомы и на q-плече 13-й хромосомы, от 4 до 8 маркерных хромосом. Также, как и у других иммортализованных линий кератиноцитов, таких как NM1 и NIKs, у данной клеточной линии наблюдается трисомия 8 хромосомы (у NaCaT тетрасомия), увеличение числа генов которой предположительно ответственно за спонтанную иммортализацию кератиноцитов [5].

В результате иммунофлуоресцентного окрашивания культуры клеток была выявлена экспрессия маркера базальных кератиноцитов – кератина 14 (K14) (рис. 2а), причем в паттерне экспрессии K14 практически отсутствует сеть

филаментов. Также клетки показывают отрицательную окраску по кератину 5. Ранее сообщалось, что экспрессия этих кератинов является маркером онкотрансформации и оба кератина являются активными участниками сохранения способности к активной пролиферации [9], поэтому пути, способствующие трансформации полученных нами клеток, еще предстоит выяснить в последующих работах. Клетки также имеют негативное окрашивание по кератину 10 (K10) и транскрипционному фактору р63, а часть ядер клеток положительно окрашивается на теломеразу (рис. 2б).

При трансплантации в мышей линии Nude Crl:NU(NCr)-Foxn1nu (Charles River, Германия) данные клетки образуют опухоли, в которых обнаруживаются клетки, экспрессирующие теломеразу (рис. 3г). Среди них есть клетки, экспрессирующие K14 и K10, выявляется также маркер поздней стратификации эпидермиса – лорикрин (рис. 3а, 3б, 3в). Также наблюдаются большие тканевые образования без выраженных ядерных структур, но положительные при окраске антителами против материала ядер человека, что может быть следствием терминальной дифференцировки клеток в опухоли. Такая особенность в стратификации отмечалась исследователями ранее для спонтанно иммортализованной линии клеток кератиноцитов – NaCaT в условиях трансплантации иммунодефицитным мышам [10].

При создании кожных эквивалентов иммортализованные нами кератиноциты ведут себя схожим образом вне зависимости от используемой среды. Они образуют пласт, состоящий из 15–30 слоев клеток. Все клетки в пласте экспрессируют K14, а клетки в верхних слоях и отдельные клетки в толще экспрессируют K10 подобно клеткам NaCaT (рис. 4б, 4д). При этом наблюдается нормальная экспрессия коллагена 7 в районе базального слоя (рис. 4в, 4е).

Мы показали с помощью метода TRAPEZE telomerase detection kit (Millipore), что уровень активности теломеразы в полученной нами новой линии клеток сохраняется на протяжении почти 20 пассажей и выше, чем в NaCaT и HeLa (рис. 5), и что вкуче с другими изменениями говорит о глубокой трансформации метаболизма клеток.

Можно предположить, что поскольку сверхэкспрессии теломеразы недостаточно для иммортализации кератиноцитов, в данной линии клеток произошли геномные перестройки и были сформированы дополнительные эпигенетические изменения, позволившие, независимо от теломеразы, перейти клеткам этой культуры к другому состоянию, приведшему к иммортализации.

Данная клеточная линия может стать ценным инструментом во многих исследованиях, связанных с изучением механизмов межклеточных вза-

имодельствий, опухолеобразования и клеточной дифференцировки.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по получению первичной клеточной линии выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-29-04044), иммортализация и характеристика линии выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-90066).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kim N.W. et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 1994. V. 266, № 5193. P. 2011–2015.
2. *Dickson M.A. et al.* Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16INK4a-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics // *Mol Cell Biol*. 2000. V. 20. № 4. P. 1436–1447.
3. *Kiyono T. et al.* Both Rb/p16 INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells: 6706 // *Nature. Nature Publishing Group*, 1998. V. 396. № 6706. P. 84–88.
4. *Smits J.P.H. et al.* Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models: 1 // *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 2017. V. 7. № 1. P. 11838.
5. *Allen-Hoffmann B.L. et al.* Normal Growth and Differentiation in a Spontaneously Immortalized Near-Diploid Human Keratinocyte Cell Line, NIKS // *Journal of Investigative Dermatology*. 2000. V. 114. № 3. P. 444–455.
6. *Beilin A.K. et al.* The Reconstructed Human Epidermis in vitro – a Model for Basic and Applied Research of Human Skin: 2 // *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2020. V. 96, № 2. P. 24–34.
7. *Miyawaki S. et al.* Teratoma Formation Assay for Assessing Pluripotency and Tumorigenicity of Pluripotent Stem Cells // *Bio-protocol*. 2017. V. 7. № 16. P. e2518–e2518.
8. *Kosykh A. et al.* Postnatal neural crest stem cells from hair follicle interact with nerve tissue in vitro and *in vivo* // *Tissue and Cell*. 2018. V. 54. P. 94–104.
9. *Srivastava S.S. et al.* Keratin 5/14-mediated cell differentiation and transformation are regulated by TAp63 and Notch-1 in oral squamous cell carcinoma-derived cells // *Oncology reports. Spandidos Publications*, 2018. V. 39. № 5. P. 2393–2401.
10. *Breitkreutz D. et al.* Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants // *Eur. J. Cell Biol*. 1998. V. 75. № 3. P. 273–286.

IMMORTALIZATION OF HUMAN KERATINOCYTES USING THE CATALYTIC SUBUNIT OF TELOMERASE

A. K. Beilin^{a,b}, N. G. Gurskaya^{a,b}, N. A. Evtushenko^{b,c}, E. V. Alpeeva^a, A. V. Kosykh^{a,b}, V. V. Terskikh^a, Corresponding Member of RAS A. V. Vasiliev^{a,c}, and Corresponding Member of RAS E. A. Vorotelyak^{a,b,c,#}

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

^b *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

^c *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

A new stable line of human keratinocytes was obtained. The cells have altered morphology, both abnormal chromosomal composition and expression of keratinocyte markers, do not show contact inhibition, could be cultured in various media and have limited stratification ability *in vitro*. Upon transplantation into nude mice the cells have tumorigenic properties.

Keywords: human keratinocytes, hTERT, transduction, spontaneous transformation, immortalization, cell culture, skin equivalent, mice, tumorigenicity

УДК 616. 13–004.6–085.547–092: 615.225

БИС(μ-ТАРТРАТО)ДИ(μ-ГИДРОКСО) ГЕРМАНАТА (IV) ТРИЭТАНОЛАММОНИЯ КАК ИНГИБИТОР ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂ МОНОНУКЛЕАРОВ

© 2021 г. Академик РАН П. А. Стороженко¹, М. М. Расулов^{1*}, И. В. Жигачёва², В. П. Барышок³

Поступило 25.07.2020 г.
После доработки 07.09.2020 г.
Принято к публикации 11.09.2020 г.

Изучено ранее неизвестное свойство бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония влиять на активность основной фосфолипазы A₂. Выявлено, что введение животным водного раствора бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония ежедневно в течение 2 мес в дозе активного вещества 10 мг/кг массы животного приводит к угнетению общей активности основной фосфолипазы A₂ моноклеаров. Результаты исследования могут быть использованы для коррекции липидного обмена при развитии нарушений в условиях гиперлипидемий. Это позволяет расширить область применения бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония и создать на его основе новые фармакологические препараты для предотвращения и угнетения развития гиперлипидемий.

Ключевые слова: гиперлипидемии, бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония, атеросклероз, щелочная фосфолипаза A₂

DOI: 10.31857/S2686738921010224

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что на раннем этапе атерогенеза активируется эндотелий, который экспрессирует на своей поверхности адгезионные молекулы для моноцитов (Мц), нейтрофилов и лейкоцитов крови и продуцирует хемоаттрактанты, привлекающие Мц в интиму сосудов. Мц, попав в субэндотелиальное пространство, дифференцируются в макрофаги, которые ускоряют образование окисленных липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Частицы модифицированных ЛНП захватываются макрофагами, после чего последние трансформируются в пенистые клетки и играют ключевую роль в развитии атеросклеротических нарушений [1, 2]. При этом известно, что струк-

турная и функциональная целостность Мц и их нуклеиновых кислот определяются состоянием сосудистого русла как на макро, так и на микроциркуляторном уровне [3–5].

Исследования эффектов химических соединений, изменяющих активность фосфолипазы A₂ (ФЛА₂) (КФ 3.1.1.14) – лизосомального липолитического фермента, имеющего оптимум действия при щелочных значениях рН и участвующего в атерогенезе, привлекают особое внимание, поскольку изменение активности ФЛА₂ под влиянием тех или иных средств может служить критерием эффективности антиатеросклеротических препаратов. При этом существует потребность в поиске и внедрении в практику новых диагностических и лекарственных средств, обладающих указанной активностью и тем самым обеспечивающих торможение атерогенеза. В этом плане особо интересным представляется класс протатранов, в том числе – герматранов, обладающих биологической активностью [6]. Тем не менее вопросы о биохимических свойствах ряда герматранов и их механизмов действия остаются малоизученными. В этой связи задачей настоящего исследования явилось изучение влияния на активность основной (щелочной) фосфолипазы A₂ моноклеаров нового вещества – бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония (далее – вигетан). Это биоло-

¹ Государственный научный центр РФ “Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений”, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования “Иркутский государственный технический университет”, Иркутск, Россия

*e-mail: maksud@bk.ru

гически активное соединение, имеет следующую формулу: $[(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_3\text{NH}^+]_2[\text{Ge}_2(\mu\text{-Tart})_2(\mu\text{-OH})_2]^{2-}$, где: Tart – остаток винной кислоты – $\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{O}-)\text{CH}(\text{O}-)\text{C}(\text{O})\text{O}-$.

МЕТОДИКА

Исследование проводили на кроликах Шиншилла с исходной массой 1.8–2.0 кг в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации”. Правила утверждены приказом Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003 г № 267 (Правила лабораторной практики в Российской Федерации Министерства здравоохранения РФ Приказ от 19 июня 2003 г. № 267 <http://www.kodeks.ru> (24 апреля 2010 г.)). По окончании эксперимента животным проводили эвтаназию цервикальной дислокацией 5-го позвонка, соблюдая правила “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986).

Гиперлипидемию у кроликов вызывали стандартным методом Аничкова-Халатова [5].

Кроликов разделяли на следующие группы (по 10 голов):

1) группа опыта, которым вводили внутримышечно свежеприготовленный водный раствор бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в дозе активного вещества 10 мг/кг веса животного, в течение 2 мес.

2) группа плацебо – контроля, которым вводили внутримышечно эквивалентное количество официального 0.9% раствора натрия хлорида в течение 2 мес.

Эталоном служили данные, полученные у 10 интактных кроликов.

В конце экспериментов в крови животных стандартными методами определяли содержание липидов, триацилглицеринов, β-липопротеинов и холестерина.

Мононуклеары (моноциты – Мц) выделяли из крови путем последовательного центрифугирования в градиенте фикол-верографин [7]. Гепаринизированную кровь разводили 0.9% официальным раствором натрия хлорида в соотношении 1:1 и осторожно наслаивали раствор фикола с 76% верографинном, центрифугировали 45 мин при 600 g. После центрифугирования отбирали Мц и вновь центрифугировали их 30 мин при 1200 g. Полученные в виде осадка Мц трехкратно отмывали физиологическим раствором в соотношении 5:1, центрифугируя по 10 мин при 1200 g. Осадок гомогенизировали в 2 мл 0.25M раствора сахарозы рН 7.4 с 0.001M ЭДТА. Активность ФЛА₂ определяли радиометрическим методом с использованием в качестве субстрата синтезированного ра-

нее 1-ацил-2(13-Н) арахидоноил-глицеро-3sn-фосфорилхолина [7]. Инкубационная смесь содержала 150 нмоль меченого лецитина, 8 ммоль СаCl₂ при рН 8.0 и источник ферментов (исследуемые Мц) в конечном объеме 1.3 мл. Инкубацию проводили на водяной вибробане в течение 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 3 мл смеси хлороформ: метанол (1:2 об/об) и немедленно экстрагировали по методу Клайера и Дайера. Продукты реакции разделяли тонкослойной хроматографией в закрепленном слое силикагеля (“Chemapol”) на стеклянных пластинах размером 20 × 20 см в системе растворителей хлороформ: метанол:вода (65:25:4). Фракции лизолецитина, лецитина и жирных кислот экстрагировали смесью хлороформ:метанол (1:2 об/об). Экстракты помещали во флаконы с 10 мл сцинтилляционной жидкости, содержащей в 100 мл толуола особой чистоты 5 г 2.5-дифениллоксазола и 300 мг 1.4-бис-(5-фениллоксазол-2)-бензола. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике “Rackbeta 1215” ЛКБ (Швеция). Об активности ФЛА₂ судили по образованию меченой жирной кислоты, получившейся в результате воздействия этих ферментов на 1-ацил-2(13-Н)-арахидонил-глицеро-3sn-фосфорилхолин.

Активность ФЛА₂ выражали в микромолях образовавшихся продуктов в минуту на 1 г белка.

Статистическую обработку данных проводили определением средних арифметических и их стандартных ошибок. Достоверность различий между вариантами со значимостью $p \leq 0.05$. Обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прежде всего отметим, что для природных и синтетических биологически активных веществ (БАВ) необходим подбор концентраций, обладающих наибольшей эффективностью в проявлении биологической активности, поэтому в эксперименте применялся бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в виде раствора разных концентраций. Дозовые эффекты вигетана изучались при введении количества вещества в диапазоне 5–20 мг/кг животного. Влияние вещества в каждой дозе изучалось в отдельной группе кроликов. Наряду с этим, принимая во внимание важность путей введения и их зависимость от растворителя, были проведены специальные, дополнительные исследования с раствором вигетана в официальном 0.9% растворе NaCl (физиологическом растворе) и введением в количествах только 5 и 10 мг/кг массы животного. При этом наиболее выраженными оказались данные, полученные в группах животных, получав-

ших водный раствор вигетана из расчета 10 мг/кг. Именно эти результаты привлекают, на наш взгляд, наибольший интерес, и именно они будут представлены далее.

Выявлено, что при применении бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в виде водного 10% раствора в моноцитах (Мц) снижается уровень холестерина и общих липидов (табл. 1).

Результаты ферментативного анализа свидетельствуют, что развитие атеросклероза сопровождается значительным увеличением суммарной активности ФЛА₂ в Мц по сравнению с эталоном (табл. 2). При введении вигетана достоверно снижается активность ФЛА₂ в Мн по сравнению с контролем, что, вероятно, сопровождается и снижением интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8].

Активацию лизосомального липолиза можно рассматривать как компенсаторную реакцию ферментных систем на фоне преобладания неспецифического нерегулируемого эндоцитоза модифицированных ЛНП или надмолекулярных ЛНП-содержащих комплексов. При этом в условиях субстратного насыщения может возникнуть относительная недостаточность отдельных лизосомальных ферментов, в частности ФЛА₂. ФЛА₂ секретируется в виде профермента, и для ее активации требуется гидролиз специфических пептидных связей. Для проявления каталитической активности ФЛА₂ необходим Ca²⁺ в миллимолярных концентрациях. При этом активация ФЛА₂ происходит в результате индуцированного свободными радикалами ПОЛ мембран, которое характерно для многих патологических процессов, в том числе и для атерогенеза.

Рост активности ФЛА₂ приводит к гидролизу мембранных фосфолипидов Мц и высвобождению свободных жирных кислот, включая арахидоновую кислоту (АрК), предшественника эйкозаноидов [9]. АрК имеет ключевое значение в продукции провоспалительных медиаторов — арахидоновой кислоты (АрК) и эйкозаноидов, т.е. всех метаболитов АрК.

АрК образуется из фосфолипидов мембран лейкоцитов и/или тромбоцитов. Существует два основных пути метаболизма АрК — циклоксигеназный и липоксигеназный. Конечными продуктами циклоксигеназного пути являются простагландины и тромбоксаны, а липоксигеназного — гидроксизайкозатриеновая кислота и лейкотриены. Помимо циклоксигеназы и липоксигеназы, выявлен третий фермент — эпоксигеназа, который окисляет АрК в эпоксиэйкозатриеновую кислоту и дигидроксиэйкозатриеновую кислоту. Высвобождение АрК происходит преимущественно через активацию ФЛА₂, а фосфатидилхо-

Таблица 1. Показатели липидного обмена при применении бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в физиологическом растворе

Показатели	Сыворотка крови
Эталон – интактные	
Липиды общие (моль/л)	4.3 ± 0.4
Холестерин (моль/л)	3.5 ± 0.3
Триацилглицерины (моль/л)	1.7 ± 0.2
β-липопротеины (моль/л)	0.78 ± 0.09
Контроль – нелеченые	
Липиды общие (моль/л)	72.4 ± 4.9 **
Холестерин (моль/л)	34.5 ± 1.9 **
Триацилглицерины (моль/л)	16.2 ± 2.1 **
β-липопротеины (моль/л)	3.8 ± 0.3 **
Опыт – вигетан, 10 мг/кг	
Липиды общие (моль/л)	30.1 ± 1.9* **
Холестерин (моль/л)	17.9 ± 0.8* **
Триацилглицерины (моль/л)	6.2 ± 0.32* **
β-липопротеины (моль/л)	0.89 ± 0.07* **

Примечание. * $p < 0.05$ по отношению к контролю;

** $p < 0.05$ по отношению к эталону.

Таблица 2. Изменения активности ФЛА₂ в моноцитах кроликов (мкмоль/мин на 1 г белка) при применении бис(μ-тарtrato)ди(μ-гидроксо) германата (IV) триэтаноламмония в физиологическом растворе

Объект	Эталон	Контроль	Опыт
Моноциты	1.85 ± 0.03*	3.1 ± 0.1**	1.9 ± 0.06* **

Примечание. * $p < 0.05$ по отношению к контролю;

** $p < 0.05$ по отношению к эталону.

лин является первичным субстратом. Высвобождаемые ФЛА₂ АрК и докозагексаеновая кислота (ДГК) подвержены перекисному окислению свободными радикалами кислорода, что приводит к образованию 4-гидроксиноненалей (4-ГН) из ФЛА₂ и 4-гидроксигексеналей (4-ГГН) из ДГК [10]. Эти алкенальные электрофилы являются реактивными и способны образовывать аддукты с белками, фосфолипидами и нуклеиновыми кислотами. Воспринимаемые цитотоксические и гормональные эффекты этих гидроксикаленалей влияют на клеточные сигнальные пути, метаболизм глюкозы и функции митохондрий при хронических и воспалительных заболеваниях. Можно предположить, что защитный эффект препарата обусловлен снижением интенсивности ПОЛ, что влечет за собой снижение активности ФЛА₂ [9, 10]. Следовательно, ФЛА₂ принимает участие в многочисленных физиологических процессах, включая иммунные реакции, воспаление, пролиферацию, вазо- и бронхоконстрикцию и т.д. [10, 11].

ВЫВОДЫ

1) применение раствора химического соединения – бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидрокси) германата (IV) триэтаноламмония приводит к достоверному снижению общей активности основной (щелочной) фосфолипазы A₂ мононуклеаров (Мн);

2) полученные результаты указывают на возможность создания на основе бис(μ-тарtrato) ди(μ-гидрокси) германата (IV) триэтаноламмония новые фармакологические препараты для предотвращения нарушений липидного обмена и улучшения качества жизни пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Daniel J. Rader and Alan Daugherty. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis // *Nature* 2008. V. 451. P. 904–913. <https://doi.org/10.1038/nature>
2. Yuan Jing-jing, Yang Jing, Sun Shi-lei, Zhang Rui, Xu Yu-ming. Endothelial Progenitor Cells' Classification // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. August 2017. V. 14 (4). P. 327–332.
3. Bautista-Niño P.K., Portilla-Fernandez E., Vaughan D.E., Danser A.H., Roks A.J. “DNA Damage: A Main Determinant of Vascular Aging” // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. V. 17 (5). P. 748. <https://doi.org/10.3390/ijms1705074827213333>
4. Shah A.V., Bennett M.R. “DNA damage-dependent mechanisms of ageing and disease in the macro- and microvasculature” // *European Journal of Pharmacology*. 2017. V. 816. P. 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.05028347738>
5. Аничков С.В., Зводская И.С., Морева Е.В., Веденева З.И. Нейрогенные дистрофии и их фармакотерапия // Л.: Медицина, 1968. 238 с.
6. Rasulov M., Namakanov B., P. Storozhenko. Adaptive processes of cardiovascular system in arterial hypertension // Lambert Academic Publishing, reha gmbh, 66111, Saarbrucken, 2017. 206 p.
7. Расулов М.М., Бобкова С.Н., Стороженко П.А. Фармакологическая коррекция и контроль течения гиперлипидотеинемий и ишемической болезни сердца // Lambert Academic Publishing, reha gmbh, 66111, Saarbrucken, 2013. 254 с.
8. Binyukov V.I., Mil' E.M., Zhigacheva I.V., Generozova I.P., Rasulov M.M. Morphological and bioenergetical characteristics of mitochondria under stress and the action of the organogermanium compounds // *Journal of Nature Science & Sustainable Technology*. 2015. V. 9 (2). P. 439–444.
9. Yang Bo, Fritsche K.L., Beversdorf D.Q., et al. Yin-Yang Mechanisms Regulating Lipid Peroxidation of Docosa-hexaenoic Acid and Arachidonic Acid in the Central Nervous System // *Front Neurol*. 2019. V. 10. P. 642.
10. Zimmer S., Grebe A., Bakke S.S., Bode N., Halvorsen B., Ulas T., Skjelland M., De Nardo D., Labzin L.I., Kerk-siek A., Hempel C., Heneka M.T., Hawxhurst V., Fitzgerald M.L., Trebicka J., Björkhem I., Gustafsson J.Å., Westertorp M., Tall A.R., Wright S.D., Espevik T., Schultze J.L., Nickenig G., Lütjohann D., Latz E. “Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming” // *Science Translational Medicine*. April 2016. V. 8 (333). P. 333ra50. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad610027053774>
11. Tsikas D. “Combating atherosclerosis with heavy PUFAs: Deuteron not proton is the first” // *Atherosclerosis*. September 2017. V. 264. P. 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.01828756876>

BIS (μ-TARTRATO) DI (μ-HYDROXO) GERMANATE (IV) TRIETHANOLAMMONIUM AS AN ALKALINE PHOSPHOLIPASE A₂ INHIBITOR MONONUCLEARS

Academician of the RAS P. A. Storozhenko^a, M. M. Rasulov^{a, #}, I. V. Zhigacheva^b, and V. P. Baryshok^c

^a State Scientific Center of the Russian Federation “State Order of the Red Banner of Labor Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds”, Moscow, Russian Federation

^b Federal State Budgetary Institution of Science “Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel”, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Federal State Budgetary Institution of Higher Education “Irkutsk State Technical University”, Irkutsk, Russian Federation

[#]e-mail: maksud@bk.ru

It was established that the administration of an aqueous solution of bis (μ-tartrato) di (μ-hydroxo) germanate (IV) triethanolammonium to animals daily for 2 months at a dose of the active substance of 10 mg / kg of the animal's weight leads to inhibition of the total activity of the main phospholipase A₂ of mononuclear cells. The results of the study can be used to correct lipid metabolism in the development of disorders in conditions of hyperlipidemia. This allows you to expand the scope of the studied substance and create new pharmacological preparations based on bis (μ-tartrato) di (μ-hydroxo) germanate (IV) triethanolammonium to prevent and inhibit the development of hyperlipidemia.

Keywords: hyperlipidemia, atherosclerosis, alkaline phospholipase A₂, bis (μ-tartrato) di (μ-hydroxo) germanate (IV) triethanolammonium

УДК 577.34

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН И МУТАГЕНЕЗ ЛЮЦИФЕРАЗЫ ГРИБА *Neonothopanus nambi*

© 2021 г. К. А. Береговая¹, Н. М. Мышкина¹, Т. В. Чепурных¹, А. А. Котлобай¹, К. В. Пуртов^{2,*},
В. Н. Петушков², Н. С. Родионова², И. В. Ямпольский¹

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном

Поступило 28.08.2020 г.

После доработки 09.09.2020 г.

Принято к публикации 11.09.2020 г.

Недавно изученная биолюминесцентная система грибов имеет большой потенциал для создания на ее основе высокоэффективных инструментов для биомедицинских исследований. Ключевым компонентом этой системы является фермент люцифераза. Люцифераза гриба *Neonothopanus nambi* относится к новому, еще не описанному, семейству белков. Данные по структурной организации этого фермента практически отсутствуют. Детальное изучение свойств люциферазы *N. nambi* необходимо для усовершенствования методов детекции, основанных на использовании биолюминесцентной системы грибов. В данной работе, с помощью биоинформатических методов анализа и экспериментальных подходов, установлены положения некоторых ключевых аминокислотных остатков, влияющих на функциональность изучаемого фермента. Полученные данные полезны для дальнейших работ по установлению пространственной структуры люциферазы гриба *N. nambi*.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, *Neonothopanus nambi*, рациональный дизайн

DOI: 10.31857/S2686738921010054

Разнообразные биолюминесцентные системы находят широкое применение в различных областях биологии и медицины, а люциферин-люциферазная реакция лежит в основе множества аналитических методов, применяемых *in vivo* и *in vitro* [1–3]. Несмотря на то что явление биолюминесценции изучается достаточно давно, далеко не все варианты механизмов, лежащих в ее основе, уже описаны. На сегодняшний день путь биосинтеза люциферина из стандартных клеточных метаболитов полностью изучен только для систем морских бактерий и высших грибов порядка *Agaricales* (более 80 видов) [4–7]. Биолюминесцентная система грибов описана недавно, однако возможность ее применения для анализа в различных гетерологических системах уже доказана экспериментально. Так, она послужила основой для создания автономно биолюминесцирующих дрожжей, клеток млекопитающих и растений [5, 8].

Ключевым ферментом для процесса биолюминесценции грибов является люцифераза, которая катализирует окисление люциферина грибов (3-гидроксигиспидина) кислородом. Процесс сопровождается выделением кванта света. Люцифераза гриба *Neonothopanus nambi* (nnLuz) относится к новому семейству белков, представители которого также были найдены в геномах других видов светящихся грибов. Изучение строения и свойств nnLuz позволит усовершенствовать инструментарий на основе биолюминесцентной системы грибов и расширить область ее применения в биомедицинских исследованиях.

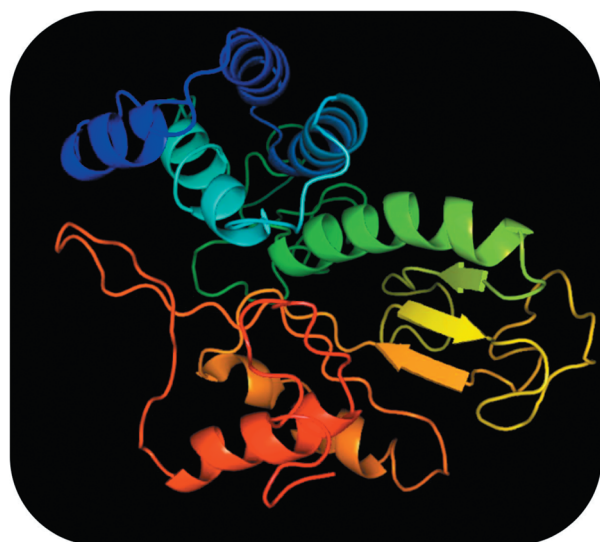
Биоинформатические ресурсы, использующие различные базы данных, могут предсказать пространственную организацию люциферазы грибов, однако отсутствие охарактеризованных гомологов nnLuz снижает достоверность таких предсказаний. Исследования структуры люциферазы гриба *N. nambi* при помощи программного обеспечения TMHMM-server и I-TASSER предсказывают наличие 6 α -спиралей и 6 β -слоев в изучаемом белке (рис. 1).

Кроме того, согласно полученным данным, протяженный α -спиральный участок на N-конце изучаемого белка длиной в 40 аминокислотных остатков предположительно является трансмем-

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

² Институт биофизики Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия

*e-mail: purtovk@mail.ru



C-score = -4.72
 Estimated TM-score = 0.30 ± 0.09
 Estimated RMSD = $15.5 \pm 3.3 \text{ \AA}$

Рис. 1. Предсказание пространственной структуры люциферазы *N. nambi* (I-TASSER).

бранным. Биоинформатические предсказания пространственной структуры белков нуждаются в экспериментальной проверке, однако определение структуры белков, связанных с мембраной методами кристаллографии и ЯМР-спектроскопии, является сложной задачей. Получение функционального фрагмента люциферазы *N. nambi*, лишённого предсказанного трансмембранного домена, позволило бы упростить структурный анализ. Для решения этой задачи мутантные формы *nnLuz*, не содержащие первых 6, 9, 12, 15, 21, 25, 28, 31, 34, 37 и 40 N-концевых аминокислотных остатков, получали методом ПЦР для последующего клонирования в вектор pET-23b, который затем использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus.

Биолюминесцентный анализ лизатов клеток бактерий, несущих указанные мутантные гены, показал, что функциональность люциферазы грибов сохраняется при отсутствии части N-концевых аминокислотных остатков, вплоть до 37. Пример такого анализа можно видеть на рис. 2.

Биолюминесцентный анализ мутантных форм люциферазы *N. nambi*, полученных методом случайного мутагенеза, показал, что замены аминокислот V49R, D127N, R136Q, S144T/R, D173N, R176Q/P, E237K/Q, E238K/R приводят к нарушению функционирования фермента и, вероятно, играют ключевую роль в процессе катализа. Данные мутанты были получены в условиях повышенного содержания ионов марганца (640 мкМ) и неравных концентраций нуклеотид-3-фосфа-

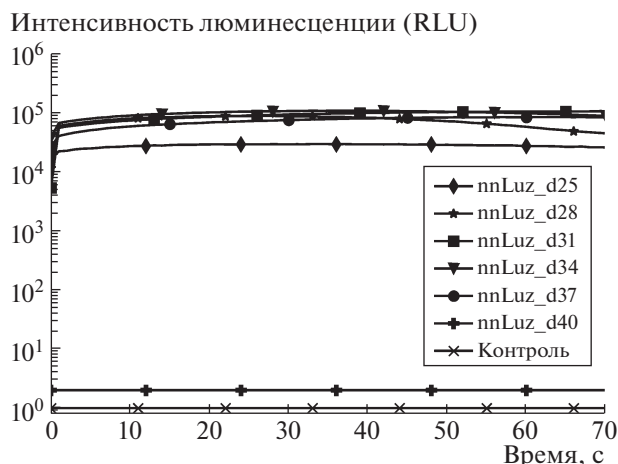


Рис. 2. Анализ биолюминесценции лизатов клеток бактерий, несущих гены мутантных форм *nnLuz*, не содержащих первых 25, 28, 31, 34, 37 и 40 N-концевых аминокислотных остатков. В качестве отрицательного контроля был использован лизат не трансформированных клеток *E. coli* штамма BL21-CodonPlus.

тов (dATP – 200 мкМ, dGTP – 400 мкМ, dTTP – 1 мМ, dCTP – 1 мМ). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей описанных люцифераз высших грибов с помощью ресурса Uniprot демонстрирует наличие консервативных участков, общих для всех белков данного семейства (рис. 3), при этом данные консервативные участки включают в себя некоторые указанные выше положения (R136, D173, R176, E237, E238). Согласно описанному ранее механизму биолюминесцентной реакции грибов [9], субстрат сначала депротонируется в процессе основного катализа и только потом вступает в реакцию с кислородом.

Как правило, в процессе такого катализа ключевую роль играют заряженные аминокислотные остатки лизина, гистидина, аспартата или глутамата, поэтому нельзя исключить, что аминокислотные остатки в положениях R136, D173, R176, E237, E238 входят в состав активного центра люциферазы. Для оценки роли конкретных аминокислотных остатков для структуры и функционирования *nnLuz* было решено использовать методику аланинового скрининга, подразумевающую замену аминокислотных остатков в определенных положениях на аланин.

Для получения мутантных форм *nnLuz* в генетическую последовательность люциферазы дикого типа (*nnLuz WT*) вносили изменения с помощью ПЦР по методу Quick change [10]. Указанные генетические последовательности входили в состав векторов, содержащих также промотор глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (pGAP), терминатор алкогольоксидазы (AOXt) и предназначенных для трансформации клеток дрожжей

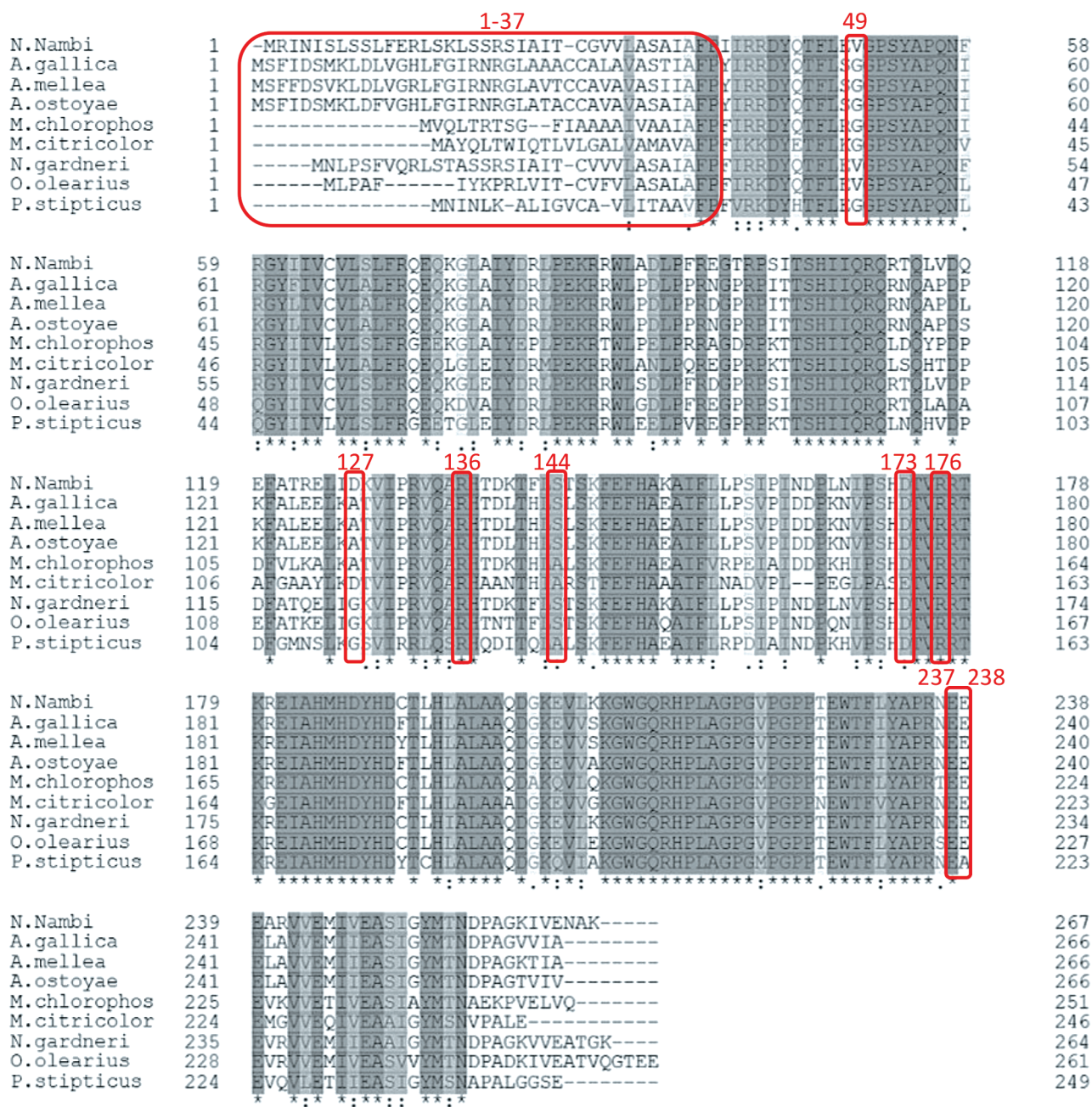


Рис. 3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей люцифераз грибов *Armillaria gallica*, *A. mellea*, *A. ostroyae*, *Micena chlorophos*, *M. citricolor*, *Neonothopanus nambi*, *N. gardneri*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus*. Положения вносимых мутаций выделены красными рамками.

Pichia pastoris. Культивацию и трансформацию дрожжей проводили по стандартной методике [11]. Съемку дрожжевых колоний осуществляли по методу Drop-test [12] на приборе Fusion-Pulse.7 (Vilber Lourmat). Сравнение функциональной активности модифицированной nnLuz, аминокислотные остатки V49, D127, R136, S144, D173, R176, E237, E238 которой были заменены на аланин, показало отсутствие люминесцентной активности всех экспериментальных линий, за исключе-

нием мутанта V49A, в случае которого было детектировано увеличение сигнала в 1.7 раза (рис. 4).

Таким образом, в результате данной работы установлены положения некоторых ключевых аминокислотных остатков, непосредственно влияющих на функционирование люциферазы гриба *N. nambi*. Также было показано, что отсутствие вплоть до тридцати семи N-концевых аминокислотных остатков, формирующих гипотетический трансмембранный участок, практически не влия-

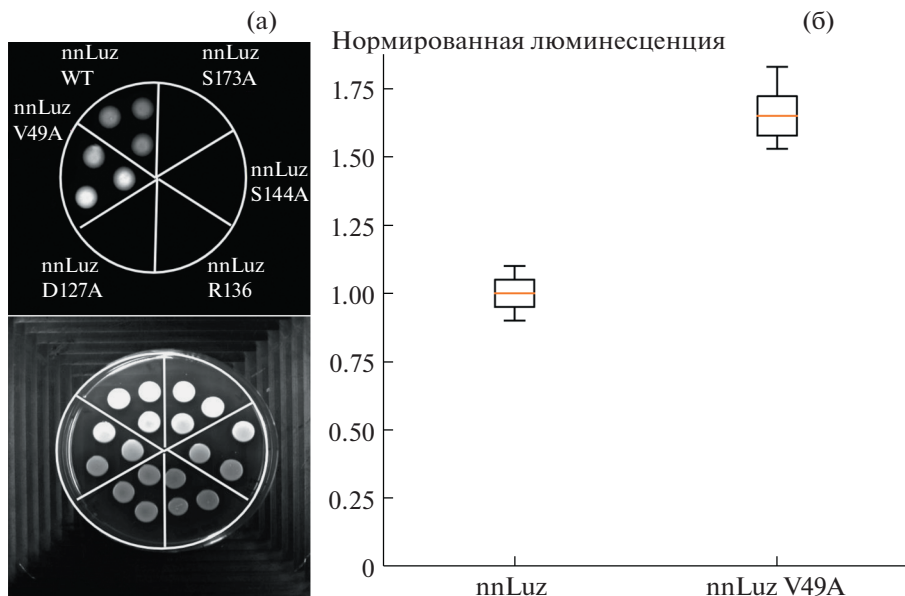


Рис. 4. Сравнение мутантов nnLuz в дрожжевой культуре *Pichia pastoris*. (а) Свечение дрожжевых колоний, экспрессирующих мутантные и нативную формы nnLuz в ответ на добавление люциферина (верхнее фото), эти колонии в видимом свете (нижнее фото); (б) Нормированная люминесценция nnLuz дикого типа (nnLuz WT) и мутантной формы nnLuz V49A в ответ на добавление люциферина. Полученный сигнал был нормирован на значения сигнала nnLuz WT.

ет на активность изучаемого фермента. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы для получения образца nnLuz, пригодного для исследования методами кристаллографии и ЯМР-спектроскопии, с целью экспериментального установления пространственной структуры люциферазы гриба *N. nambii*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФ № 16-14-00052-П, аланиновый скрининг проводили за счет гранта Президента для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2605.2020.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan Y., Shi P., Song W., Bi S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: *in vitro* and *in vivo* Perspectives. // *Theranostics*. 2019. V. 9. P. 4047–4065. <https://doi.org/10.7150/thno.33228>
2. Fleiss A., Sarkisyan K.S. A brief review of bioluminescent systems. // *Current Genetics*. 2019. V. 65. P. 877–882. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00951-5>
3. Pomper M.G., Gelovani J.G. *Molecular Imaging in Oncology*. // CRC Press. 2008. 744 p. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2004.0060>
4. Chew A.L.C., Desjardin D.E., Tan Y.-S., et al. Bioluminescent fungi from Peninsular Malaysia—a taxonomic and phylogenetic overview. // *Fungal Divers*. 2015. V. 70. P. 149–187. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0302-9>
5. Shimomura O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. // World Scientific Publishing, Singapore. 2006. 470 p. <https://doi.org/10.1142/6102>
6. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA*. 2018. V. 115. P. 12728–12732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115>
7. Mitiouchkina T., Mishin A.S., Somermeyer L.G., et al. Plants with genetically encoded autoluminescence. // *Nature Biotechnology*. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0500-9>
8. Oliveira A.G., Desjardin D.E., Perry B.A., Stevani C.V. Evidence that a single bioluminescent system is shared by all known bioluminescent fungal lineages. // *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2012. V. 11. P. 848–852. <https://doi.org/10.1039/c2pp25032b>
9. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., et al. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. // *Science Advances*. 2017. P. e1602847. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602847>
10. Bok J.W., Keller N.P. Fast and easy method for construction of plasmid vectors using modified quick-change mutagenesis. // *Methods of Biochemical Analysis*. 2012. V. 944. P. 163–174. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-122-6_11

11. Pichia expression kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and PICZ-alpha in *Pichia pastoris* Catalog. // 2009. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf.
12. *Kwolek-Mirek M., Zadrąg-Tecza R.* Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. // FEMS yeast research. 2014. V. 14. P. 1068–1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>

RATIONAL DESIGN AND MUTAGENESIS OF FUNGAL LUCIFERASE FROM *Neonothopanus nambi*

**K. A. Beregovaja^a, N. M. Myshkina^a, T. V. Chepurnykh^a, A. A. Kotlobay^a, K. V. Purtoy^{b,#},
V. N. Petushkov^b, N. S. Rodionova^b, and I. V. Yampolsky^a**

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

^b *Institute of Biophysics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, Krasnoyarsk, Russian Federation*

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

Presented by academician of the RAS I.I. Gitelzon

The recently described bioluminescent system from fungi has great potential for developing highly efficient tools for biomedical research. Luciferase enzyme is one of the most crucial components of this system. The luciferase from *Neonothopanus nambi* fungus belongs to the novel still undescribed protein family. The structure data for this protein is almost absent. A detailed study of the *N. nambi* luciferase properties is necessary for the improvement of analytical methods based on the fungal bioluminescent system. Here we present the positions of key amino acid residues and their effect on enzyme function described using bioinformatic and experimental approaches. These results are useful for further fungal luciferase structure determination.

Keywords: bioluminescence, luciferase, *Neonothopanus nambi*, rational design

УДК 577.218

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Xmas-2, ОСНОВНОГО БЕЛКА TREX-2 КОМПЛЕКСА ЭКСПОРТА мРНК, И БЕЛКА Orc3, СУБЪЕДИНИЦЫ ORC КОМПЛЕКСА *D. melanogaster*

© 2021 г. М. М. Куршакова^{1,*}, Д. В. Копытова¹, член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹

Поступило 23.09.2020 г.

После доработки 29.09.2020 г.

Принято к публикации 30.09.2020 г.

Белковый комплекс TREX-2 является ключевым участником экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Ранее у *D. melanogaster* был выделен белковый комплекс, состоящий из комплекса TREX-2 и комплекса ORC. Было показано, что в составе TREX-2-ORC комплекса белок Xmas-2, который является платформой для сборки TREX-2, взаимодействует с белком Orc3. Целью данной работы было исследовать, какие участки аминокислотной последовательности Xmas-2 участвуют во взаимодействии с Orc3. Показано, что для взаимодействия Xmas-2 с Orc3 необходим участок С-концевой последовательности Xmas-2, расположенный с 3'-стороны от CID-домена.

Ключевые слова: Xmas-2, Orc3, TREX-2, mRNA export

DOI: 10.31857/S2686738921010145

Экспорт мРНК из ядра в цитоплазму является важным этапом экспрессии генов. С мРНК на разных стадиях ее созревания и экспорта связываются различные белки, формируя так называемую мРНК частицу. Белки в составе мРНК частицы регулируют процессинг и экспорт мРНК через ядерные поры [1]. Ключевым участником экспорта является эволюционно консервативный белковый комплекс TREX-2, который ассоциирован с ядерной порой и необходим для экспорта мРНК.

Комплекс TREX-2 был впервые выделен у дрожжей. Центральной субъединицей комплекса является белок Sac3, который служит платформой для сборки остальных субъединиц комплекса – белков Cdc31, Thp1, двух молекул белка Sus1, а также кофактора Sem1p. [2, 3]. Делеция любой из субъединиц TREX-2 приводит к нарушениям экспорта мРНК [2–5]. Комплексы, гомологичные TREX-2 дрожжей, были обнаружены у растений и человека [6, 7]. В нашей группе был описан TREX-2 *D. melanogaster* [8], показано, что TREX-2 ассоциирован с ядерной порой и необходим для экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Основой комплекса является белок Xmas-2, гомологичный Sac3, с которым взаимодействуют белки ENY2 и

PCID2, соответствующие дрожжевым Sus1 и Thp1. Затем в нашей группе был выделен совместный комплекс TREX-2 с ORC комплексом. ORC комплекс эволюционно консервативен, состоит из шести субъединиц – Orc1, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 [9]. У дрожжей ORC комплекс распознает сайты начала репликации и необходим для инициации репликации. Однако у высших эукариот гомологичные ORC комплексы проявляют дополнительные свойства, не связанные с репликацией [10]. Было показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицей TREX-2-зависимым образом и необходимы для экспорта мРНК. Субъединицы ORC взаимодействуют с экспортным адаптером NXF1 и влияют на связывание NXF1 с мРНК частицей. Было высказано предположение, что белки ORC совместно с TREX-2 входят в состав мРНК частицы, участвуя на каком-то этапе в экспортном пути мРНК.

Ранее было показано, что в составе TREX-2-ORC комплекса белок Orc3 физически взаимодействовал с белками Xmas-2 и ENY2, а также с мРНК [9, 11]. Было высказано предположение, что взаимодействие Xmas-2 и Orc3 отвечает за взаимодействие TREX-2 и ORC комплексов [11]. С целью понять, как происходит взаимодействие TREX-2 и ORC, в данной работе была поставлена задача исследовать, какие области аминокислотной последовательности Xmas-2 участвуют в связывании белка Orc3.

С целью выделить функциональные домены Xmas-2 был проведен сравнительный анализ ами-

¹ Федеральное государственное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: kursha@mail.ru

нокислотных последовательностей Xmas-2 и его гомолога у человека белка GANP, для которого определены области взаимодействия с белками TREX-2 комплекса человека и мРНК [7, 12, 13]. На N-конце Xmas-2 расположены RRM-домен и M-домен, гомологичные домены у GANP осуществляют взаимодействие с мРНК. M-домен и расположенный внутри него WH-домен у GANP участвуют во взаимодействии с PCID2. В С-концевой части Xmas-2 находится CID-домен, который у GANP необходим для связывания двух молекул ENY2. Последовательность на С-конце Xmas-2 варьируема между различными эукариотическими организмами и не содержит определенного мотива.

Были созданы экспрессионные конструкции Xmas-2-N, Xmas-2-C, Xmas-2-dRRM, Xmas-2-dM, Xmas2-dCID, кодирующие различные участки белка Xmas-2 в одной рамке считывания с FLAG-эпитопом (рис. 1а). Xmas-2-N конструкция содержала N-концевую половину последовательности Xmas-2 (1–670 а.о.), Xmas-2-C конструкция кодировала С-концевую половину последовательности Xmas-2 (673 а.о.–1359 а.о.), которая включала CID-домен. В конструкции Xmas-2-dRRM (253–1359 а.о.) отсутствовал фрагмент N-концевой последовательности Xmas-2, содержащий RRM-домен, но последовательности, кодирующие M-домен и CID-домен, оставались ненарушенными. Конструкция Xmas-2-dM (440–1359 а.о.) представляла собой укороченный с N-конца вариант Xmas-2-dRRM и содержала WH-домен и CID-домен, при этом M-домен был нарушен. Конструкция Xmas2-dCID (835–1359 а.о.) содержала С-концевой участок Xmas-2, расположенный с 3'-стороны от CID-домена. Участки кодирующей последовательности Xmas-2 были клонированы в вектор pAc5.1/V5 His B (Invitrogen) в одной рамке считывания с тремя FLAG-эпитопами на N-конце. Трансформация S2 клеток *D. melanogaster* конструкциями проводилась при помощи MACSfectin Reagent (Miltenyi Biotec) по протоколу производителя.

Далее определяли, с каким фрагментом Xmas-2-FLAG взаимодействует эндогенный Orc3 (рис. 1б). В качестве положительного контроля использовался полноразмерный Xmas-2-FLAG (full). Все фрагменты Xmas-2-FLAG успешно экспрессировались, что было подтверждено их осаждением антителами к FLAG-эпитопу из тотальных лизатов S2 клеток. Далее методом иммуноосаждения проверили, какие фрагменты Xmas-2 взаимодействуют с Orc3. Антитела к Orc3 [9] соосаждали вместе с Orc3 все тестируемые Xmas-2-FLAG фрагменты, кроме N-концевого фрагмента. Взаимодействие между эндогенным Orc3 и фрагментами Xmas-2-C, Xmas-2-dRRM, Xmas-2-dM, Xmas2-dCID детектировалось на одинаковом уровне. Все эти фрагменты содержали участок

С-концевой аминокислотной последовательности Xmas-2, 835–1359 а.о., расположенный с 3'-стороны от CID-домена. Следовательно, С-концевой участок Xmas-2 был достаточен для связывания эндогенного Orc3, при этом наличие CID-домена не являлось необходимыми для взаимодействия.

Весь эндогенный Orc3 находится в составе комплекса ORC, вследствие чего другие белки комплекса могут влиять на исследуемое взаимодействие. Поэтому на следующем этапе мы исследовали прямое взаимодействие оверэкспрессированных Xmas-2-FLAG фрагментов и оверэкспрессированного (свободного от других белков комплекса ORC) Orc3, слитого с HA-эпитопом (Orc3-HA) (рис. 1в). В качестве положительного контроля использовался полноразмерный Xmas-2-FLAG (full). Все фрагменты Xmas-2-FLAG были осаждены антителами к FLAG-эпитопу. Orc3-HA был соосажен с фрагментами Xmas-2-dRRM и Xmas-2-C, но не детектировался с Xmas-2-dCID. Антитела к HA-эпитопу осадили Orc3-HA и соосадили фрагменты Xmas-2-C, Xmas-2-dRRM и Xmas2-dCID. Взаимодействие между Orc3-HA и фрагментом Xmas-2-dM-FLAG обнаружить не удалось, что может быть объяснено низким уровнем экспрессии этого фрагмента в S2 клетках. Взаимодействие между Orc3-HA и Xmas-2-N не было детектировано.

Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие Xmas-2 и Orc3 в составе TREX-2-ORC комплекса осуществляется через С-концевую область Xmas-2, расположенную с 3'-стороны от CID-домена. N-конец Xmas-2 и содержащиеся там RRM-, M-, WH-домены не являются необходимыми для взаимодействия Xmas-2 с Orc3.

Для взаимодействия С-концевого участка Xmas-2 с эндогенным Orc3 наличие CID-домена не являлось необходимым. Однако взаимодействие оверэкспрессированных Xmas-2 фрагментов и Orc3-HA друг с другом при наличии CID-домена улучшалось. В первом случае Xmas-2 фрагмент связывается с Orc3, который находится в составе ORC комплекса и ассоциирован с ENY2 [9, 11], а во втором оверэкспрессированные фрагменты Xmas-2 и Orc3 взаимодействуют без участия других белков. Было показано, что в составе TREX-2-ORC комплекса Orc3 непосредственно связывается с двумя молекулами ENY2, а ENY2 ассоциируется с С-концевой частью Xmas-2, вероятно, в области CID-домена [8, 11]. Можно предположить, что ассоциация эндогенного Orc3 с ENY2 и другими белками ORC изменяет конформацию Orc3, улучшая его способность взаимодействовать с С-концевой областью Xmas-2. Дальнейшие исследования общего комплекса TREX-2-ORC и его взаимодействия с мРНК ча-

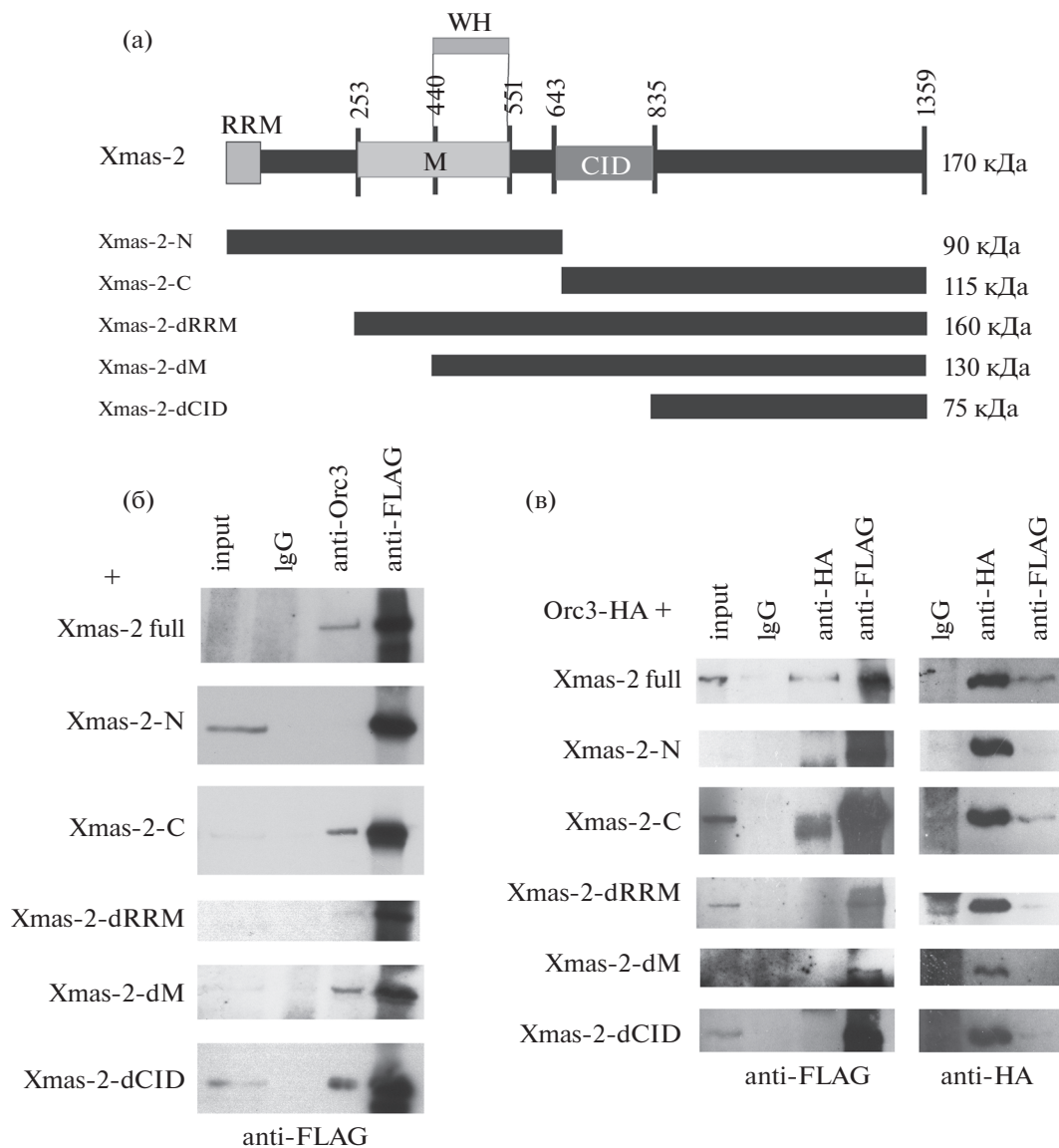


Рис. 1. Взаимодействие фрагментов Xmas-2 с Orc3. (а) Схема доменной организации белка Xmas-2 и последовательностей тестируемых Xmas-2-FLAG фрагментов, указаны названия фрагментов и молекулярные массы сверхэкспрессированных белков. (б) Вестерн-блот анализ взаимодействия фрагментов Xmas-2-FLAG и эндогенного Orc3 в реакциях иммуноосаждения из тотальных лизатов трансформированных S2 клеток с использованием антител к FLAG-эпиту. В качестве отрицательного контроля проводили реакцию с использованием IgG. Антителами к FLAG-эпиту были осаждены соответствующие рекомбинантные белки: Xmas-2 full – массой около 170 кДа, Xmas-2-N ~ 90 кДа, Xmas-2-C ~ 115 кДа, Xmas-2-dRRM ~ 160 кДа, Xmas-2-dM ~ 130 кДа, Xmas-2-dCID ~ 75 кДа. Поликлональными антителами к Orc3 был осажден Orc3 и соосаждены Xmas-2-FLAG фрагменты, содержащие С-концевой участок Xmas-2 с 3'-стороны от CID-домена. (в) Вестерн-блот анализ взаимодействия фрагментов Xmas-2-FLAG и Orc3-HA в реакциях иммуноосаждения с использованием антител к FLAG- и HA-эпитомам из тотальных лизатов котрансформированных S2 клеток. Детекция проводилась при помощи антител к FLAG- и HA-эпитомам. В качестве отрицательного контроля проводили реакцию с использованием IgG.

стицей внесут вклад в понимание механизмов экспорта мРНК.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00861.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куршакова М.М., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. // Молекулярная биология. 2016. V. 50. №. 5. P. 723–729.
2. Fischer T., Strasser K., Racz A., et al. // The EMBO journal. 2002. V. 21. P. 5843–5852.
3. Fischer T., Rodriguez-Navarro S., Pereira G., et al. // Nature cell biology. 2004. V. 6. P. 840–848.
4. Rodriguez-Navarro S., Fischer T., Luo M., et al. // Cell. 2004. V. 116. P. 75–86.
5. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. // Molecular cell. 2009. V. 33. P. 727–737.
6. Lu Q., Tang X., Tian G., et al. // The Plant journal: for cell and molecular biology. 2010. V. 61. P. 259–270.
7. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. // Nucleic acids research. 2012. V. 40. P. 4562–4573.
8. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., et al. // The EMBO journal. 2007. V. 26. P. 4956–4965.
9. Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., et al. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. P. 4920–4933.
10. Popova V., Brechalov A. // Nonreplicative functions of the origin recognition complex 2018. V. 9. P. 460–473.
11. Popova V., Georgieva S., Kopytova D. // Biochemistry and molecular biology journal. 2016. V. 2. P. 2–14.
12. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E. et al. // Nat Struct Mol Biol. 2012. V. 19. P. 328–336.
13. Jani D., Valkov E., Stewart M. // Nucleic acids research. 2014. V. 42. P. 6686–6697.

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN Xmas-2, THE MAIN PROTEIN OF TREX-2 mRNA EXPORT COMPLEX, AND THE Orc3 PROTEIN, A SUBUNIT OF ORC COMPLEX OF *D. melanogaster*

M. M. Kurshakova^{a,#}, D. V. Kopytova^a, and Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva^a

^a *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

The TREX-2 protein complex is a key participant in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm through nuclear pores. Previously, in *D. melanogaster* a protein complex consisting of TREX-2 and ORC complexes was purified. It was shown that in the TREX-2-ORC complex Xmas-2 protein, which is the platform for TREX-2 assembly, interacts with the Orc3 protein. The aim of this work was to investigate which regions of the Xmas-2 amino acid sequence are involved in the interaction with Orc3. It was demonstrated that the interaction of Xmas-2 with Orc3 requires a C-terminal region of Xmas-2 located downstream of the CID domain.

Keywords: Xmas-2, Orc3, TREX-2, mRNA export

УДК 577.2

МЕЖХРОМОСОМНЫЕ КОНТАКТЫ ГЕНОВ рРНК В ТРЕХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА СВЯЗАНЫ С САЙЛЕНСИНГОМ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ МОРФОГЕНЕЗ

© 2021 г. Н. А. Чуриков^{1,*}, Е. С. Клушевская¹, Ю. В. Кравацкий¹,
Г. И. Кравацкая¹, Д. М. Федосеева¹

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым

Поступило 05.10.2020 г.

После доработки 09.10.2020 г.

Принято к публикации 10.10.2020 г.

Для изучения влияния теплового шока на образование контактов генов рРНК с генами *DUX* в хромосоме 4 человека использовали метод 4С. Наши данные свидетельствуют о том, что эти контакты пропадают после теплового шока. Ранее было показано, что кластеры генов рРНК наиболее часто контактируют с областями супер-энхансеров, имеющих протяженные метки H3K27ac. Недавно было обнаружено, что супер-энхансеры вовлечены в образование разделения фаз в ядре. Вместе взятые эти данные свидетельствуют о том, что обратимые контакты кластеров генов рРНК вовлечены в механизмы регуляции с помощью разделения фаз в ядре.

Ключевые слова: гены рРНК, межхромосомные контакты, 4С, сайленсинг генов, морфогенез, эпигенетика

DOI: 10.31857/S2686738921010078

Укладка хромосом в ядре важна как для компактизации ДНК, так и для регуляции экспрессии генов. Появление новых молекулярных методов для полногеномного анализа трехмерных структур хромосом позволяет выявлять не только сближенные внутрихромосомные области, которые, прежде всего, связаны с компактной укладкой хромосом, но и более редкие межхромосомные контакты, которые вовлечены в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов [1–4]. Ядрышки являются самыми крупными органеллами в ядрах. Они не отделены от хромосом мембранами и потенциально могут влиять на экспрессию генов в областях разных хромосом, контактирующих с ядрышками. Имеется пять кластеров генов рРНК, которые формируют ядрышки. Они расположены на коротких плечах пяти акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21 и 22 человека. Давно было обнаружено, что в поли-тенных хромосомах дрозофилы ядрышки образуют устойчивые контакты с определенными областями в разных хромосомах [5]. Это позволяет предполагать как постоянство трехмерной орга-

низации хромосом, так и влияние ядрышек на конкретные области в разных хромосомах. С помощью метода 4С (circular chromosome conformation capture) было обнаружено, что ядрышки в клетках человека образуют наиболее частые контакты с областями хромосом, имеющими протяженные области (15–50 kb) меток активного хроматина H3K27ac, которые характерны для супер-энхансеров [6, 7]. Известно, что в раннем развитии гетерохроматизация генов рРНК, которые и формируют ядрышки, сопровождается репрессией или активацией разных генов мыши [8]. Недавно было обнаружено, что ядрышки в клетках человека линии HEK293T, происходящей из почки эмбриона, образуют частые контакты с генами, вовлеченными в дифференцировку и канцерогенез [9]. Поэтому было интересно выяснить, с какими генами ядрышки контактируют в клетках, имеющих разное происхождение.

В настоящей работе мы выявили гены, которые наиболее часто контактируют с ядрышками в двух новых линиях клеток человека – K562, которая происходит из клеток миелоидной лейкемии, и hESM01, содержащей эмбриональные стволовые клетки [10]. В результате нами впервые обнаружено, что в клетках человека, имеющих разное происхождение, ядрышки образуют наиболее устойчивые контакты с определенной группой генов. Она включает несколько сотен генов, кон-

¹ Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

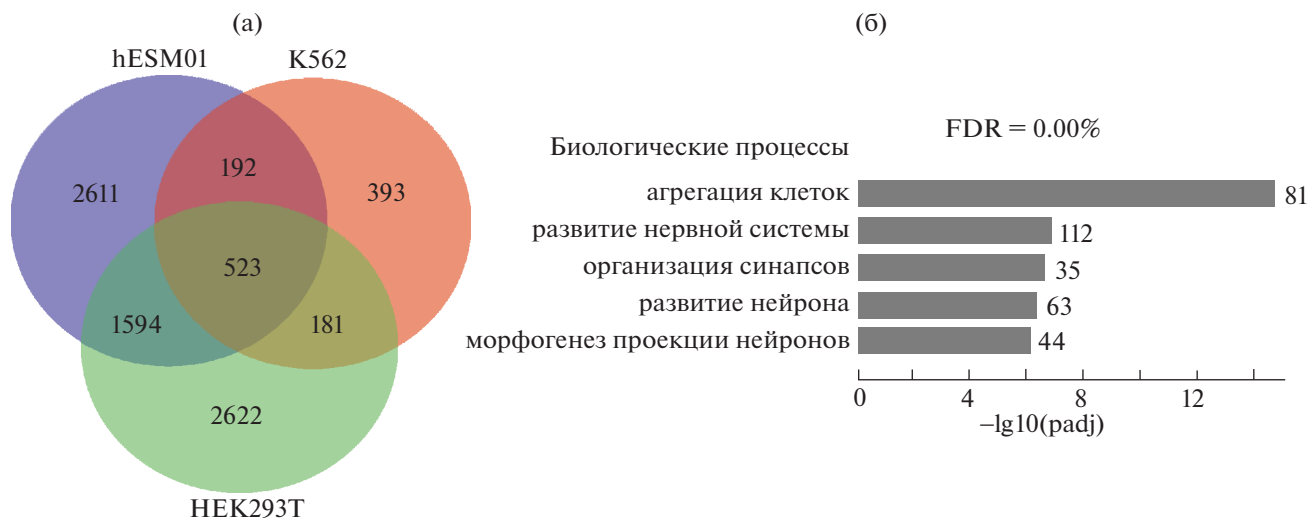


Рис. 1. Анализ генов, контактирующих с ядрышками. (а) Диаграмма Венна, иллюстрирующая перекрытие между генами, контактирующими с ядрышками в трех линиях клеток человека. Для анализа были взяты гены, обнаруживающие 100 и более контактов с ядрышками (100 или более чтений 4С). (б) Анализ 523 генов, общих для трех линий клеток, в базе данных GO (<https://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>). Показаны пять наиболее частых ассоциаций этих генов с биологическими процессами. Числа у черных прямоугольников указывают число генов, ассоциированных с конкретным процессом.

тролирующих развитие. Среди них имеется более сотни генов, которые в ходе дифференцировки подвергаются концертному сайленсингу, приобретая метку репрессированного хроматина H3K27me3. Эти результаты позволяют предполагать, что при дифференцировке экспрессия этой группы генов в разных типах клеток выключается с помощью контактов с неактивными кластерами генов pPНК.

Контакты генов pPНК в клетках K562 и hESM01 выявляли с помощью метода 4С, как описано ранее [6, 9]. Препараты ДНК после процедуры 4С использовали для амплификации с помощью pPНК-специфических праймеров 5' TCTTTGAAAAAATCCAGAGTGGT 3' и 5' AAGTCCAGAAATCAACTCGCCAGT 3'. Библиотеки для глубокого секвенирования получали, используя наборы реактивов Illumina. Чтение библиотек длиной по 150 нуклеотидов проводили на приборе Illumina HiSeq 1500. Полученные чтения (по две биологических реплики, каждая по 10 млн. чтений) картировали на геном человека версии hg19 с помощью пакета программ BWA. Данные реплик хорошо коррелировали — Pearson = 0.99. Результаты глубокого секвенирования 4С-pPНК помещены в базу данных GEO (accession number GSE49193).

Частоту контактов ядрышек с разными районами хромосом оценивали по числу картированных чтений 4С. В результате были получены списки генов, наиболее часто контактирующих с ядрышками. На рис. 1 представлена диаграмма Венна, показывающая перекрытие между гена-

ми, которые наиболее часто контактируют с ядрышками в трех линиях клеток. Видно, что 523 гена во всех трех линиях — общие. Анализ этих генов в базах Gene Ontology (GO) выявил, что они высоко ассоциированы с контактами между клетками, развитием и морфогенезом. Вместе с тем видно, что имеются значительные различия в местах контактов ядрышек в клетках разного происхождения. Так, в линии hESM01 имеется 2611 генов (около 53%), которые имеют контакты с ядрышками только в этой линии клеток. Этот результат свидетельствует о том, что около половины контактов ядрышек являются специфичными для данного типа клеток. Таким образом, имеются общие и специфические для каждого вида клеток контакты ядрышек с генами. Этот факт подтверждает наше предположение, согласно которому ядрышки участвуют в эпигенетической регуляции больших групп генов [9].

Для дальнейшего анализа генов, общих для трех линий клеток, мы использовали ресурс Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). В результате были получены новые интересные данные об этих 523 генах, регулирующих развитие. Например, в базе ENCODE Histone Modifications 2015 этого ресурса найдена высокая ассоциация ($\text{padj} < 3.5 \cdot 10^{-14}$) 90–140 генов с сайленсингом с помощью гистоновой метки H3K27me3. Концертный сайленсинг этих генов обнаружен в разных типах клеток: в клетках эпителия бронхов и почек, в моноцитах, в клетках эндотелия, кератиноцитах, миоцитах и в ряде других. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе дифферен-

Таблица 1. Ассоциации 119 генов, контактирующих с генами рРНК и подвергающимися сайленсингу с помощью метки H3K27me3 в клетках бронхиального эпителия

Термин онтологии генов	Частота кластера генов	Частота генов в геноме	Padj	Фальшивые позитивы	Гены, аннотированные с термином
nervous system development	48 of 119 genes, 40.3%	2425 of 19751 genes, 12.3%	1.03e-11	0.00	<i>EPHA5, ASTN2, UNC5C, DSCAM1L1, ZNF804A, HAPLN1, PLCB1, CSMD3, FGF14, PTPRD, AUTS2, COL25A1, GPC6, SH3GL2, RELN, NRG3, PRKGI, SDKI, APBAI, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, PCDHAC1, PLXNA4, KIRREL3, CTNND2, ALK, HDAC9, CA10, ROBO1, GABRA5, SEZ6L, HECW1, CNTN4, ROBO2, CNTN5, TRPC4, EPHB1, NRG1, SCN8A, SATB2, EPHA6, DABI, NTM, SEMA6D, CLSTN2, SYNDIG1</i>
modulation of chemical synaptic transmission	21 of 119 genes, 17.6%	452 of 19751 genes, 2.3%	3.84e-10	0.00	<i>CACNAID, STXBPP5L, DGKI, CNTN4, PLCB1, SYN3, FGF14, GRM7, PLCLI, GRM1, RELN, NRG3, EPHB1, DLGAP1, APBAI, SORCS3, DCC, CACNB2, SLC24A2, GRID1, CLSTN2</i>
regulation of trans-synaptic signaling	21 of 119 genes, 17.6%	453 of 19751 genes, 2.3%	4.01e-10	0.00	<i>CACNAID, STXBPP5L, DGKI, CNTN4, PLCB1, SYN3, FGF14, GRM7, PLCLI, GRM1, RELN, NRG3, EPHB1, DLGAP1, APBAI, SORCS3, DCC, CACNB2, SLC24A2, GRID1, CLSTN2</i>
generation of neurons	35 of 119 genes, 29.4%	1552 of 19751 genes, 7.9%	4.23e-09	0.00	<i>EPHA5, ASTN2, UNC5C, DSCAM1L1, ZNF804A, CSMD3, PTPRD, AUTS2, COL25A1, SH3GL2, RELN, NRG3, PRKGI, SDKI, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, KIRREL3, PLXNA4, CTNND2, ALK, HDAC9, ROBO1, GABRA5, HECW1, CNTN4, ROBO2, EPHB1, NRG1, SATB2, EPHA6, DABI, NTM, SEMA6D</i>
neuron development	30 of 119 genes, 25.2%	1134 of 19751 genes, 5.7%	4.31e-09	0.00	<i>ALK, EPHA5, UNC5C, ROBO1, GABRA5, DSCAM1L1, CNTN4, HECW1, ZNF804A, CSMD3, PTPRD, AUTS2, ROBO2, COL25A1, SH3GL2, RELN, PRKGI, EPHB1, SDKI, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, EPHA6, DABI, SEMA6D, KIRREL3, NTM, PLXNA4, CTNND2</i>
neurogenesis	36 of 119 genes, 30.3%	1654 of 19751 genes, 8.4%	5.30e-09	0.00	<i>EPHA5, ASTN2, UNC5C, DSCAM1L1, ZNF804A, CSMD3, PTPRD, AUTS2, COL25A1, SH3GL2, RELN, NRG3, PRKGI, SDKI, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, KIRREL3, PLXNA4, CTNND2, ALK, HDAC9, ROBO1, GABRA5, HECW1, CNTN4, ROBO2, TRPC4, EPHB1, NRG1, SATB2, EPHA6, DABI, NTM, SEMA6D</i>
neuron differentiation	33 of 119 genes, 27.7%	1394 of 19751 genes, 7.1%	5.70e-09	0.00	<i>EPHA5, UNC5C, DSCAM1L1, ZNF804A, CSMD3, PTPRD, AUTS2, COL25A1, SH3GL2, RELN, PRKGI, SDKI, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, KIRREL3, PLXNA4, CTNND2, ALK, HDAC9, ROBO1, HECW1, CNTN4, GABRA5, ROBO2, EPHB1, NRG1, SATB2, EPHA6, DABI, NTM, SEMA6D</i>
neuron projection development	28 of 119 genes, 23.5%	1002 of 19751 genes, 5.1%	7.26e-09	0.00	<i>ALK, EPHA5, UNC5C, ROBO1, DSCAM1L1, CNTN4, HECW1, ZNF804A, CSMD3, PTPRD, AUTS2, ROBO2, COL25A1, SH3GL2, RELN, PRKGI, EPHB1, SDKI, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, EPHA6, DABI, SEMA6D, KIRREL3, PLXNA4, CTNND2</i>
neuron projection morphogenesis	23 of 119 genes, 19.3%	666 of 19751 genes, 3.4%	1.15e-08	0.00	<i>EPHA5, UNC5C, ROBO1, DSCAM1L1, CNTN4, HECW1, PTPRD, AUTS2, ROBO2, COL25A1, SH3GL2, RELN, EPHB1, ATP8A2, DCC, UNC5D, LRP2, EPHA6, DABI, SEMA6D, KIRREL3, PLXNA4, CTNND2</i>
synaptic signaling	24 of 119 genes, 20.2%	738 of 19751 genes, 3.7%	1.35e-08	0.00	<i>CACNAID, STXBPP5L, DGKI, GABRA5, CNTN4, PLCB1, SYN3, PTPRD, FGF14, GRM7, PLCLI, GRM1, RELN, NRG3, EPHB1, DLGAP1, NRG1, APBAI, SORCS3, DCC, CACNB2, SLC24A2, GRID1, CLSTN2</i>

цировки разных типов клеток человека большие группы генов, контактирующих с ядрышками, подвергаются сайленсингу с помощью метки H3K27me3. В табл. 1 приведены ассоциации с биологическими процессами 119 генов, контактирующих с генами рРНК, которые подвергаются сайленсингу с помощью метки H3K27me3 в клетках бронхиального эпителия. Результаты получены с помощью ресурса <https://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>. Видно, что репрессируются гены, которые необходимы для дифференцировки нейронов. Видимо, экспрессия этой группы генов не нужна, например, для дифференцировки бронхиального эпителия. Эти данные также свидетельствуют в пользу роли ядрышек в процессах эпигенетической регуляции экспрессии больших групп генов. В разных типах клеток эта группа генов, контролирующая развитие, подвергается концертному сайленсингу. Таким образом, в процессе дифференцировки может происходить выключение экспрессии одной и той же группы генов в разных типах клеток.

Триметильная метка H3K27me3 в гистоне H3 вносится белковым комплексом PRC2 (Polycomb repressive complex) в нуклеосомах целевых генов для их репрессии и обеспечения клеточной идентичности [13]. Ранее мы обнаружили, что места контактов ядрышек часто содержат метку активного хроматина – H3K27ac, которая содержит ацетилированный тот же 27-й лизин гистона H3 [9]. Следовательно, ядрышки могут контактировать с генами, вызывая либо их активацию, либо сайленсинг. Известно, что эти контакты динамичны и могут изменяться при физиологических воздействиях, что свидетельствует в пользу регуляторной роли ядрышек [12, 14].

Пока неясно, как гены рРНК, контактируя с разными генами, могут вызывать активацию или репрессию соответствующих генов. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что это происходит с помощью механизма разделения жидких фаз в ядре (liquid-liquid phase separation) [12]. Такое разделение фаз и образование транскрипционных микрокапель (transcriptional condensates) может происходить с участием ядрышек, которые являются самыми большими органеллами в ядре. Тот факт, что супер-энхансеры вовлечены в механизмы образования разделения фаз в ядре [15], и что гены рРНК часто контактируют с областями супер-энхансеров, имеющих протяженные метки H3K27ac [6, 9, 12], дает основание считать, что ядрышки, являясь крупными органеллами, регулируют большие группы генов с помощью механизма разделения фаз. Известно, что активные кластеры генов рРНК находятся во внутренней области ядрышка, в фибриллярных центрах. Тем не менее образование фаз может приводить к образованию компарментов, содержащих активаторы транскрипции или репрессоры транскрип-

ции [15, 16]. Мы предполагаем, что активные кластеры генов рРНК образуют транскрипционно активные микрокапли, а репрессированные кластеры – неактивные конденсаты. Разные области хромосом попадают в эти микрокапли, что обеспечивает активацию или репрессию больших групп генов при дифференцировке. При этом соответствующие гены сближаются с ядрышками. В настоящее время мы изучаем колокализацию разных генов с ядрышками с помощью FISH.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00122) и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-01134 и 18-04-00198).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят М.А. Лагарькову за предоставления клеток линии hESM01.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dekker J., Rippe K., Dekker M. Capturing chromosome conformation. // *Science*. 2002. V. 95 P. 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
2. Sidorenko D.S., Sidorenko I.A., Zykova T.Y., Goncharov F.P., Larsson J., Zhimulev I.F. Molecular and genetic organization of bands and interbands in the dot chromosome of *Drosophila melanogaster*. // *Chromosoma*. 2019. V. 128, P. 97–117. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00703-x>
3. Ghavi-Helm Y., Jankowski A., Meiers S., Viales R.R., Korbel J.O., Furlong E.E.M. // Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nat Genet*. 2019. V. 51 (8), P. 1272–1282. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0462-3>
4. Sarnataro S., Chiariello A.M., Esposito A., Prisco A., Nicodemi M. Structure of the human chromosome interaction network. // *PLoS One*. 2017. V. 12 (11): e0188201. doi: . eCollection 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188201>
5. Ananiev E.V., Barsky V.E., Ilyin Y.V., Churiko, N.A. Localization of nucleoli in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. // *Chromosoma*. 1981. V. 81. P. 619–628. PMID:6790245
6. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation. // *J. Mol. Cell. Biol*. 2015. V. 7. P. 366–382. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju038>
7. Hnisz D., Abraham B.J., Lee T.I., Lau A., Saint-André V., Sigova A.A., Hoke H.A., Young R.A. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. // *Cell*. 2013. V. 155. P. 934–947. Epub 2013 Oct 10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>

8. *Savić N., Bär D., Leone S., Fromme S.C., Weber F.A., Vollenweider E., Ferrari E., Ziegler U., Kaech A., Shakhova O., Cinelli P., Santoro R.* IncRNA maturation to initiate heterochromatin formation in the nucleolus is required for exit from pluripotency in ESCs. *Cell Stem Cell*. 2014. V. 15. P. 720–734. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.005>
9. *Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Klushevskaya E.S., Slovohtov I.Y., Chechetkin V.R., Kravatsky Y.V., Kretova O.V.* rDNA Clusters Make Contact with Genes that Are Involved in Differentiation and Cancer and Change Contacts after Heat Shock Treatment. // *Cells*. 2019 Nov 5; 8 (11): 1393. <https://doi.org/10.3390/cells8111393>
10. *Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L.* Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. // *Cell Cycle* 9: 937–946 (2010).
11. *Кретова О.В., Федосеева Д.М., Кравацкий Ю.В., Алембеков И.Р., Словохотов И.Ю., Чуриков Н.А.* Гомеотические гены DUX4, контролирующие развитие эмбриона человека на стадии двух бластомеров, окружены областями, которые образуют контакты с кластерами генов рРНК. // Молекулярная биология. 2019. Т. 53, С. 268–273 *Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Kravatsky Y.V., Alembekov I.R., Slovohtov I.Y., Tchurikov N.A.* Homeotic DUX4 Genes that Control Human Embryonic Development at the Two-Cell Stage Are Surrounded by Regions Contacting with rDNA Gene Clusters. // *Mol Biol (Mosk)*. 2019 Mar–Apr; 53 (2): 268–273. <https://doi.org/10.1134/S0026898419020083>.
12. *Чуриков Н.А., Клушевская Е.С., Кравацкий Ю.В., Кравацкая Г.И., Федосеева Д.М., Кретова О.В.* Межхромосомные контакты генов рРНК с генами DUX в хромосоме 4 человека чувствительны к тепловому шоку. // *ДАН. Науки о жизни*, 2020. Т. 490. С. 62–66. *Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Kravatsky Y.V., Kravatskaya G.I., Fedoseeva D.M., Kretova O.V.* Interchromosomal Contacts of rDNA Clusters with DUX Genes in Human Chromosome 4 Are Very Sensitive to Heat Shock Treatment. // *Dokl Biochem Biophys*. 2020 Jan; 490 (1): 50–53. <https://doi.org/10.1134/S1607672920010032>
13. *Lavarone E., Barbieri C.M., Pasini D.* Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. // *Nat Commun* V. 10. P. 1679 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09624-w>
14. *Кретова О.В., Федосеева Д.М., Кравацкий Ю.В., Клушевская Е.С., Алембеков И.Р., Словохотов И.Ю., Чуриков Н.А.* Область контактов кластеров генов рРНК с геном FANK1 соответствует неактивной хроматину. // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. С. 262–266. *Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Kravatsky Y.V., Klushevskaya E.S., Alembekov I.R., Slovohtov I.Y., Tchurikov N.A.* Contact Sites of rDNA Clusters with FANK1 Gene Correspond to Repressed Chromatin. // *Mol Biol (Mosk)*. 2020 Mar–Apr; 54(2):262–266. <https://doi.org/10.31857/S002689842002007X>
15. *Shrinivas K., Sabari B.R., Coffey E.L., Klein I.A., Boija A., Zamudio A.V., Schuijers J., Hannett N.M., Sharp P.A., Young R.A., Chakraborty A.K.* Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates. // *Mol Cell*. 2019. V. 75. P. 549–561.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.009>
16. *You K., Huang Q., Yu C., Shen B., Sevilla C., Shi M., Hermjakob H., Chen Y., Li T.* PhaSepDB: a database of liquid-liquid phase separation related proteins. // *Nucleic Acids Res*. 2020 V. 48 (D1): D354–D359. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz847>

INTER-CHROMOSOMAL CONTACTS OF rDNA CLUSTERS IN THREE HUMAN CELL LINES ARE ASSOCIATED WITH SILENCING OF GENES CONTROLLING MORPHOGENESIS

N. A. Tchurikov^{a, #}, E. S. Klushevskaya^a, Y. V. Kravatsky^a, G. I. Kravatskaya^a, and D. M. Fedoseeva^a

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

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

Presented by academician of the RAS G.P. Georgiev

In order to study the rDNA contacts with genes in three human cell lines of different origin we used 4C approach. Our data indicate that the same set of about five hundred genes frequently shape contacts with rDNA clusters in HEK293T, K652, and hESM01 cells. Gene ontology search suggests that the genes are involved in development and morphogenesis. About one hundred of these genes are highly associated with silencing by H3K27me3 mark in different normal cells including bronchial epithelial cells, keratinocytes, myoblasts, monocytes, endothelial cells, kidney epithelial cells, and some others. We conclude that the concerted silencing of specific group of rDNA-contacting genes controlling development occurs during differentiation. We suppose that the phase separation mechanisms could be involved in the rDNA-mediated silencing of a set of genes via the contacts with inactive rDNA clusters.

Keywords: rDNA, inter-chromosomal contacts, 4C, gene silencing, morphogenesis, epigenetics

УДК 578.832.1-579.22

НОВЫЕ НЕГАТИВНО-ПОЛЯРНЫЕ ГЕНЫ В РНК-ГЕНОМЕ КОРОНАВИРУСОВ

© 2021 г. Член-корреспондент РАН О. П. Жирнов^{1,2,*}, С. В. Поярков¹

Поступило 29.09.2020 г.
После доработки 07.10.2020 г.
Принято к публикации 09.10.2020 г.

Семейство коронавирусов образует липидсодержащие оболочечные вирусы, имеющие одноцепочечный РНК геном, который у разных вирусов кодирует 25–30 белков по механизму позитивно-полярной стратегии. Дополнительно в геноме коронавирусов обнаружены протяженные открытые рамки трансляции (ОРТ; гены), которые закодированы в негативно-полярной ориентации. Размер негативно-полярных генов колеблется в диапазоне 150–450 нк, что соответствует полипептидам негативно-полярных генов (negative gene protein, NGP) с м.м. $5-30 \times 10^3$ Да. Коронавирусы имеют заметные различия в количестве выявленных негативных генов. Наличие в геноме коронавирусов негативно-полярных генов дает основание рассматривать это семейство как вирусы с амбисенс стратегией генома.

Ключевые слова: коронавирусы, геном, амбисенс гены, полярность генома

DOI: 10.31857/S268673892101025X

Коронавирусы вызывают повышенный интерес в связи с угрожающим развитием пандемии у людей, вызванной штаммом SARS-CoV2 [1, 2]. Вирусы этого семейства имеют наружную липидную оболочку (оболочечные вирусы) и одноцепочечную геномную РНК, которая имеет классическую позитивную полярность и кодирует у разных вирусов 25–30 специфических белков [3]. Экспрессия вирусных белков происходит в две фазы. В первой фазе транслируется 5'-концевая часть генома с образованием 19 неструктурных белков, ns1–ns19 (см. рис. 1а). Во второй фазе транслируется 3'-концевая часть генома посредством промежуточной репликации и транскрипции генома с образованием индивидуальных мРНК, кодирующих структурные белки N, M, S, E, HE и ряд неструктурных вспомогательных белков (см. рис. 1а).

При анализе *in silico* геномной РНК коронавирусов мы обнаружили протяженные открытые рамки трансляции (ОРТ), которые начинались с кодона AUG и заканчивались классическими терминирующими кодонами UAA или UAG (табл. 1; рис. 1б). Анализ негативно-полярных зон предшествующих позиции AUG выявленных генов, в частности, наибольшего гена NGP4 (the negative gene protein 4) (нк 6137–6489) в геноме вируса SARS-CoV2, выполненный с помощью про-

граммы компьютерного предсказания рибосома-связывающих элементов, показал наличие участков, имеющих выраженную вторичную структуру с множеством шпилек и согласно критериям программы [HTTP://bioinfo.net.in/IRESPred](http://bioinfo.net.in/IRESPred) [5], обладающих высокой энергетической стабильностью (свободная энергия 85 ккал/ммоль) и структурными свойствами сайта входа рибосом, так называемого IRES (Internal Ribosome Entry Site) (рис. 1в). Такая структура 5'-прилежащей к AUG зоны может обеспечить узнавание мРНК рибосомами и последующую трансляцию белка [5]. Более того, в этой IRES-подобной зоне выявлялись два дополнительных AUG и три альтернативных CUG инициаторных кодонов в фазе трансляции +1 и/или +2, что также могло облегчать распознавание и экспрессию этого гена рибосомами по механизму сканирования [4].

Протяженность обнаруженных генов (ОРТ) варьировала в диапазоне 150–450 нуклеотидов (нк), что могло обеспечить синтез полипептидов с м.м. в 5–30 кДа. Сравнение геномов различных представителей семейства коронавирусов показало значительное разнообразие как по количеству таких негативно-полярных генов, так и по паттерну их локализации в вирусном геноме (см. табл. 1; рис. 1б). Так, у вирусов Pangolin-CoV и SARS-CoV2, которые, согласно современным представлениям, являются ближайшими родственниками (т.е. поколениями одного предшественника), обнаруживалось 29 и 21 негативных генов, соответственно, при отсутствии совпадения их позиций в геноме (рис. 1б). Напротив, при

¹ АНО Русско-немецкая академия медикосоциальных и биотехнологических наук, Москва, Россия

² Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, МЗ РФ, Москва, Россия

*e-mail: zhirnov@inbox.ru

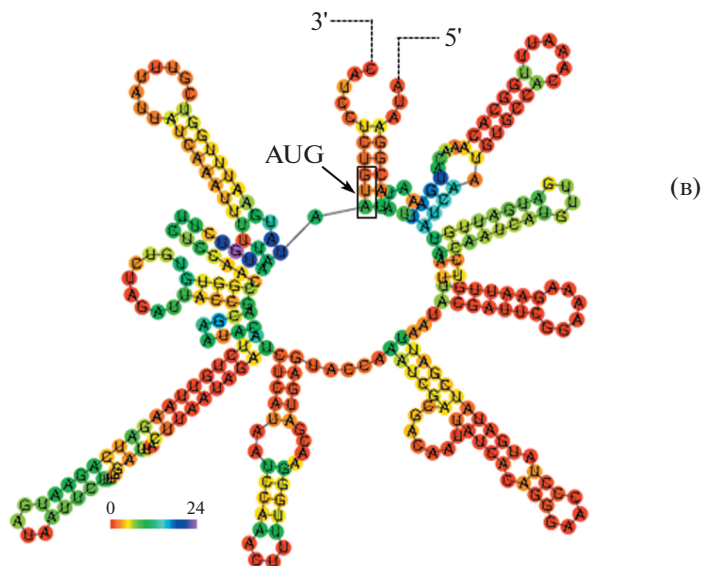
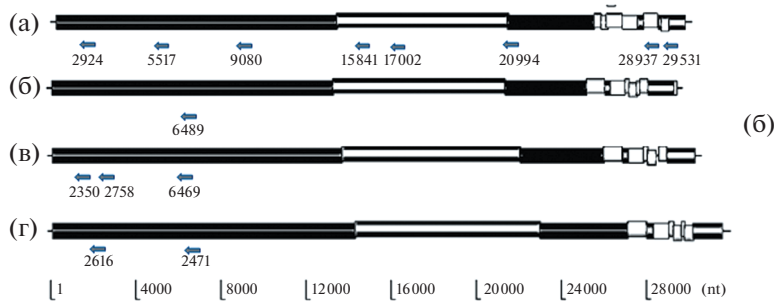
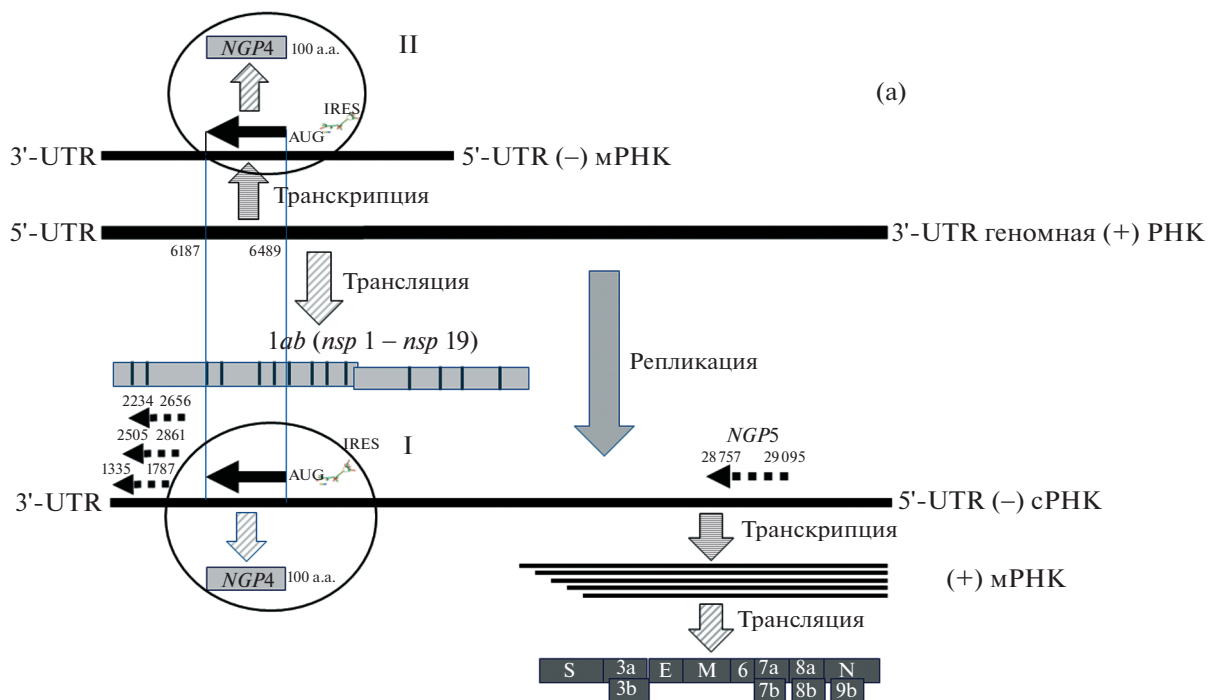


Таблица 1. Количественная характеристика выявления негативно-полярных генов (ОПТ) в геномах корона-вирусов

Вирусы ⁽¹⁾	Количество малых негативно-полярных генов с ATG/CUG кодонами 150–300 нк ⁽²⁾	Количество больших негативно-полярных генов с AUG/CUG кодонами ≥ 300 нк	Диапазон мол. м. для больших полипептидов (NGP) (кДа 10 ⁻³) ⁽³⁾
Альфа-коронавирусы корона-вирус человека HCoV-229E	29/29	1/5	12.37–14.41
Бета-коронавирусы			
SARS-CoV	34/35	0/2	11.47–14.98
MERS-CoV	32/23	8/3	11.07–18.55
SARS-CoV2	21/26	1/4	10.85–17.18
Pangolin-CoV	29/17	3/4	10.8–19.9
BAT-CoV	2/1	17/29	10.95–19.27
HKU1	15/13	1/2	13.1–21.8
Гамма-коронавирусы Avian infectious bronchitis virus	20/8	6/3	12.73–26.46
Дельта-коронавирусы Porcine coronavirus HKU15	26/29	5/3	11.19–17.35

(1) Для каждого вируса показано количество негативно-полярных генов (ОПТ – открытых рамок трансляции) и кодируемых ими полипептидов (negative genes proteins; NGP). Анализ выполнен на основании первичной структуры генов указанных вирусов: HCoV-229 (ac.n. NC_002645.1), MERS (NC_019843.3), SARS-CoV1 (NC_004718.3), SARS-CoV2 (MT635445.1), Pangolin-CoV (MT040335.1), вирус инфекционного бронхита птиц (NC_001451.1), коронавирус свиней HKU-15 (NC_039208.1), коронавирус летучей мыши Bat/RATG13 (MN996532.1), коронавирус человека HKU1 (NC_006577.2).

(2) Показано количество открытых рамок трансляции в негативной полярности генома, которые начинаются с классического инициаторного AUG (левая цифра) и через косую линию с альтернативного CUG (правая цифра) кодонов и заканчиваются терминирующим кодоном (UAA, UAG, UGA) [4].

(3) Приведены диапазоны величин молекулярных масс полипептидов из группы негативных генов протяженностью ≥300 нк, рассчитанные на основании первичной последовательности гена.

сравнении вирусов BAT-CoV и SARS-CoV2, относящихся к одному роду бета-коронавирусов, имеют близкое число классических AUG-содержащих негативных генов 17 и 21, соответственно, которые к тому же имеют сходную локализацию в геноме. Таким образом, присутствие и сходная локализация данных генов в геноме у вирусов человека и летучих мышей подтверждают генетическую и эволюционную близость данных вирусов.

Напротив, выявление 29 AUG-негативных генов в геноме вируса Pangolin-CoV (табл. 1) может говорить о том, что вопреки современным пред-

ставлениям вирус от панголинов является более дальним родственником SARS-CoV2, чем вирус летучих мышей.

Дополнительные протяженные ОПТ выявлялись в геноме коронавирусов, если в качестве стартового кодона использовались альтернативный инициаторный кодон CUG (см. табл. 1). Так же, как и для ОПТ с классическим AUG, ОПТ альтернативного типа имели IRES-подобные структуры и могли обеспечивать синтез протяженных полипептидов с молекулярной массой в диапазоне 5–30 кДа. Наличие дополнительных негатив-

Рис. 1. Схема репликации РНК-генома и локализация негативно-полярных генов в геноме коронавирусов. (а) Показана схема геномной РНК вируса и рамки трансляции вирусных генов на модели коронавирусов (ac.n. MT890462.1; SARS-CoV-2/human/RUS/20200417_10/2020). Вертикальное смещение рамки трансляции в вирусном гене отражает сдвиг фазы трансляции. UTR – концевые, не транслируемые участки РНК. Позитивно-полярные неструктурные гены (nsp1–nsp19, 3a, 4c, 7ab, 8a, 9b) и структурные (N, S, М, Е, HE) показаны рамками, закрашенными серым цветом. Негативно-полярные гены и белки обозначены NGP (negative genes proteins) и показаны широкими стрелками, заштрихованными мелкой сеткой. Белки: NGP1 (нк позиции 1335–1787), NGP2 (2505–2861), NGP3 (2234–2656), NGP5 (28757–29095) начинаются с доминантного альтернативного CUG кодона (пунктирные стрелки); белок NGP4 (нк 6187–6489; зона «позитивно-полярного» белка nsp3 (Mpro)) начинается с классического AUG кодона (сплошная стрелка). (б) Приведены схемы локализации больших негативно-полярных генов (размером ≥ 300 нк) 4 коронавирусов: (а) – MERS-CoV; (б) – SARS-CoV2; (в) – Pangolin-CoV; (г) – Bat SARS-like CoV RatGT13. Схемы составлены на основе анализа нуклеотидной последовательности в базе данных Genbank: коронавирус человека MERS (NC_019843.3), SARS-CoV (NC_004718.3), SARS-CoV2 (MT635445.1), Pangolin-CoV (MT040335.1), Bat/RATG13 (MN996532.1). Цифры обозначают нуклеотид начала гена, отсчет с 5'-конца вирусного генома. (в) Схема вторичной структуры участка перед геном NGP4 (позиции 6187–6489 нк от 5'-конца геномной (+)РНК) получены с помощью программы [HTTP://bioinfo.net.in/IRESPred](http://bioinfo.net.in/IRESPred) [5], стрелкой показан инициаторный кодон AUG.

но-полярных генов альтернативного типа в геноме коронавируса может значительно увеличить его генетическую емкость.

Результаты настоящего сообщения показывают наличие протяженных рамок трансляции (генов) в геноме коронавируса, особенность которых состоит в том, что эти гены локализованы в негативной ориентации. При этом геном коронавируса в настоящее время считается позитивно-полярным, так как все известные гены коронавируса (около 25 генов неструктурных белков и 5 главных генов для структурных белков – E, M, S, N, HE) закодированы в геномной РНК в позитивной ориентации и имеют соответствующую стратегию экспрессии генома в инфицированных клетках-мишенях (рис. 1а). Наличие новых негативно-полярных генов подразумевает существование 2 механизмов их экспрессии и возможного синтеза соответствующих мРНК и последующей трансляции белков двумя возможными способами: либо непосредственной трансляции репликативной копии геномной минус РНК (путь I), либо транскрипции геномной (+)РНК с образованием индивидуальных мРНК “негативной полярности” для их последующей трансляции с образованием специфических полипептидов (путь II) (рис. 1а, выделены окружностью). Интересно отметить, что в геноме другого семейства – вирусов гриппа, относящихся к семейству ортомиксовирусов, характеризующихся негативно-полярной стратегией геномной РНК, похожим образом обнаружены (ambisense) позитивно-полярные гены, кодируемые на вирусном негативно-полярном геноме [6–10].

Функция и значение обнаруженных новых амбиполярных вирусных генов пока не раскрыты. В случае с вирусами гриппа существует предположение о том, что выявленные новые амбисенс гены могут иметь значение в регуляции иммунного ответа на вирусные белки и/или в регуляции стабильности вирусных белков в зараженных клетках через систему деубиквитинирования белков [11–14]. Для понимания возможного функционального значения выявленных новых амбиполярных генов следует также иметь в виду две особенности, присущие данным генам. Первое – эволюционная стабильность существования амбиполярных генов у вирусов в течение длительного времени указывает на их биологическую детерминированность [11]. Второе – кодирование на одном участке молекулы РНК генов с противоположной полярностью в формате, так называемой стопки (genes stacking), позволяет значительно увеличить генетическую емкость вирусного генома и открывает для вируса новые возможности для изменчивости, повышения приспособляемости к хозяину и биологической эволюции в природе [11].

Наличие множественных амбисенс генов открывает реальную возможность кодирования мультивирионной популяции, состоящей из вирионов различного структурного типа, когда с одного генома могут синтезироваться более одного типа вирусных частиц, имеющих идентичный геном, но различный состав структурных белков. При этом часть вирионов (возможно инфекционных) может оставаться как бы невидимой (принцип “обратной стороны луны”). Более того, такой запрограммированный вирусным геномом мультивирионный профиль популяции вируса может иметь клеточную или тканевую зависимость, при которой каждый из типов вирусных частиц будет иметь автономную репликацию и репродукцию и доминировать в том или ином хозяине (органе или ткани). Данный пока гипотетический феномен репликации на одном геноме мультивирусных частиц может иметь важное значение в клеточно- или органо-зависимом патогенезе вирусного заболевания и может создать новые платформы для разработки методов лечения и вакцинопрофилактики.

Обнаруженные новые негативно-полярные гены в геноме коронавируса имеют специфическую для вирусного штамма локализацию и количественный состав в геноме (рис. 1б). Таким образом, паттерн негативно-полярных генов в геноме вирусного штамма может служить его молекулярным портретом (molecular signature) и использоваться в диагностике и изучении вирусных связей и биологической эволюции семейства коронавирусов.

Наличие потенциальных негативно-полярных генов в геноме коронавируса ставит вопрос о классификации данного семейства. В случае обнаружения в зараженных клетках или инфицированных организмах белковых продуктов, экспрессированных на матрице «негативных» генов, дает основание для отнесения семейства коронавируса к амбисенс вирусам с биполярной стратегией генома.

В настоящее время к таким амбисенс вирусам отнесены вирусы 4 родов: флебо-, тоспо-, арена- и тениовирусов [15]. Амбисенс гены, локализованные в геноме в формате стопки, обнаружены у вирусов гриппа, у которых так же, как и у коронавируса пока не идентифицирована прямая экспрессия данных генов, но имеются косвенные признаки такой экспрессии при естественной вирусной инфекции *in vivo* [12, 13]. Изучение механизмов возможной экспрессии генетической информации указанных новых генов, а также выяснение роли и значения обнаруженных генов и/или их белковых продуктов в репликации вируса может послужить основой создания нового типа вакцин и средств противовирусной химиотерапии коронавирусной инфекции.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источники финансирования отсутствуют.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность академику РАН Георгию Павловичу Георгиеву и Академику РАН Дмитрию Константиновичу Львову за полезные советы и поддержку данного направления исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu F, Zhao S, Yu B. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China // Nature 579, 265–269 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
2. Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S.D., Jin H.J., Tan K.S., Wang D.Y., Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status // Mil Med Res. 2020 Mar 13; 7 (1): 11.
<https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-032169119>
3. Fehr R.A., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis // Methods Mol. Biol. 2015; 1282: 1–23.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
4. Kearsle M.G., Wilusz J.E. Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes // Genes Dev. 2017 Sep 1; 31 (17): 1717–1731.
<https://doi.org/10.1101/gad.305250.117>
5. Kolekar P., Pataskar A., Kulkarni-Kale U., Pal J., Kulkarni A. IRESPred: Web server for Prediction of Cellular and Viral Internal Ribosome Entry Site (IRES) // Sci Rep. 2016 Jun 6; 6: 27436.
<https://doi.org/10.1038/srep2743627264539>
6. Palese Baez M., Zazra J.J., Elliott R.M., Young J.F., Palese P. Nucleotide sequence of the influenza A/duck/Alberta/60/76 virus NS RNA: conservation of the NS1/NS2 overlapping gene structure in a divergent influenza virus RNA segment // Virology. 1981 Aug; 113 (1): 397–402.
7. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V., Vorob'eva I.V., Safonova O.A., Malyshev N.A., Klenk H.D. Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation // Dokl Biochem Biophys. 2007 May–Jun; 414: 127–33.
8. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D., Malyshev N.A. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells // J Clin Virol. 2009 Aug; 45 (4): 322–33.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.03019546028>
9. Zhirnov O.P., Akulich K.A., Lipatova A.V., Usachev E.V. Negative-sense virion RNA of segment 8 (NS) of influenza A virus is able to translate in vitro a new viral protein // Dokl Biochem Biophys. 2017 Mar; 473 (1): 122–127. 2017 May 17.
<https://doi.org/10.1134/S160767291702009028510127>
10. Gong Y.N., Chen G.W., Chen C.J., Kuo R.L., Shih S.R. Computational analysis and mapping of novel open reading frames in influenza A viruses // PLoS One. 2014 Dec 15; 9 (12): e115016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115016>
11. Zhirnov O.P. Unique Bipolar Gene Architecture in the RNA Genome of Influenza A Virus // Biochemistry (Mosc). 2020 Mar; 85 (3): 387–392.
<https://doi.org/10.1134/S000629792003014132564743>
12. Hickman H.D., Mays J.W., Gibbs J., Kosik I., Magadan J.G., Takeda K., Yewdell J.W. Influenza A virus negative strand RNA is translated for CD8+ T cell immunosurveillance // J. Immunol. 2018; 201: 1222–1228.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800586>
13. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Anhlan D., Ludwig S., Isaeva E.I. Cellular immune response in infected mice to NSP protein encoded by the negative strand NS RNA of influenza A virus // MIR J 2019; 6 (1), 28–36.
<https://doi.org/10.18527/2500-2236-2019-6-1-28-36>
14. Zhong W., Reche P.A., Lai C.C., Reinhold B., Reinherz E.L. Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire // J Biol Chem. 2003 Nov 14; 278 (46): 45135–44. Epub 2003 Sep 5. PubMed
15. Nguyen M., Haenni A.L. Expression strategies of ambisense viruses // Virus Res. 2003 Jun; 93 (2): 141–50. Review.

NOVEL NEGATIVE SENSE GENES IN THE RNA GENOME OF CORONAVIRUSES

Corresponding Member of RAS O. P. Zhirnov^{a,b,#} and S. V. Poyarkov^a

^a The Russian-German Academy of Medico-Social and Biotechnological Sciences, Moscow, Russian Federation

^b The D.I. Ivanovsky Institute of Virology, The N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: zhirnov@inbox.ru

The coronavirus family consists of lipid-containing envelope viruses that have a single-stranded RNA genome that encodes 25–0 proteins in different viruses by the mechanism of positive-polar strategy. In addition, extended open reading translation frames (ORF; genes) locating in a negative-sense orientation were found in the genomes of coronaviruses. The size of negative sense genes varies in the range of 150–450 nt corresponding to negative genes polypeptides (NGP) with m. m. 5–30 kDa. Coronaviruses have marked differences from virus to virus in the number of negative genes detected. These negative sense genes in coronavirus genome make it possible to consider this family as viruses developing an ambisense genome strategy.

Keywords: coronaviruses, genome, ambisense genes, genome polarity

УДК 577.218

ИНГИБИТОР GSK3 КИНАЗЫ CHIR ПОДАВЛЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ИЗОФОРМ POU2F1 В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА *Namalwa*

© 2021 г. Е. В. Панкратова^{1,*}, Т. Н. Порцева¹, А. А. Макарова¹, академик РАН Ю. В. Ильин¹,
А. Г. Степченко¹, член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹

Поступило 23.09.2020 г.

После доработки 15.10.2020 г.

Принято к публикации 16.10.2020 г.

POU2F1(Oct-1) транскрипционный фактор, оверэкспрессия которого обнаружена во многих злокачественных опухолях человека, значительное повышение его уровня в клетках определяет злокачественный потенциал опухоли. POU2F1 представлен несколькими изоформами, транскрибируемыми с альтернативных промоторов. В В-клеточной лимфоме Беркитта *Namalwa* концентрация тканеспецифичной изоформы Oct-1L в несколько раз выше, чем в нормальных В-клетках. Мы проверили потенциальную возможность ингибировать транскрипцию отдельных изоформ Oct-1, используя ингибитор GSK3 киназы – CHIR – производное аминопиримидина. Нами было показано, что CHIR специфически влияет на экспрессию тканеспецифической изоформы Oct-1L, значительно снижая уровень мРНК и белка Oct-1L, при этом CHIR не вызывает изменения количества мРНК и белка убиквитарной изоформы Oct-1A в опухолевых клетках *Namalwa*. Полученные результаты показывают, что возможно разработать систему избирательного ингибирования изоформ фактора транскрипции Oct-1 в клетках человека для подавления лекарственной устойчивости опухолевых клеток с высоким содержанием POU2F1.

Ключевые слова: фактор транскрипции POU2F1(Oct-1), альтернативные промоторы, GSK3 киназа

DOI: 10.31857/S2686738921010194

Белок POU2F1 (Oct-1) принадлежит к POU-семейству транскрипционных факторов [1, 2]. Oct-1 экспрессируется во всех клетках человека и контролирует эмбриональное развитие, дифференцировку, клеточный ответ на стресс [3, 4]. Способность Oct-1 регулировать широкий спектр функционально различных генов и процессов основан на его способности взаимодействовать с различными сайтами ДНК [5] и подвергаться множественным посттрансляционным модификациям. Изоформы Oct-1, различающиеся по последовательности N-концевого домена, транскрибируются с альтернативных промоторов и регулируют большое количество генов-мишеней, как индивидуальных для каждой изоформы, так и общих для всех изоформ Oct-1 [4, 6–8].

Высокий уровень POU2F1(Oct-1) обеспечивает стрессоустойчивость клетки при окислитель-

ном и цитотоксическом стрессах, а также при радиационном облучении, а степень его участия в этих процессах зависит от его концентрации в клетке [3, 9]. POU2F1(Oct-1) является проонкогенным фактором и имеет прогностическое значение в развитии и лечении широкого спектра злокачественных опухолей. Высокий уровень экспрессии POU2F1(Oct-1) в опухоли связан с плохим диагностическим прогнозом. Таким образом, Oct-1 значимый транскрипционный фактор, определяющий злокачественный потенциал опухоли [9, 10].

В большом количестве типов опухолей отмечается повышенная экспрессия Oct-1, однако довольно высокий уровень его экспрессии присутствует и во многих типах нераковых клеток и тканей. Это осложняет применение противоопухолевой терапии, основанной на полном или частичном подавлении Oct-1, без учета конкретной изоформы, которая подавляется.

Изоформы Oct-1 экспрессируются в нормальных клетках в некоторых относительно стабильных, для конкретных типов клеток, соотношениях [4, 7, 8]. Нарушение уровня экспрессии отдельных изоформ Oct-1 отмечается во многих типах

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

*e-mail: panliz@mail.ru

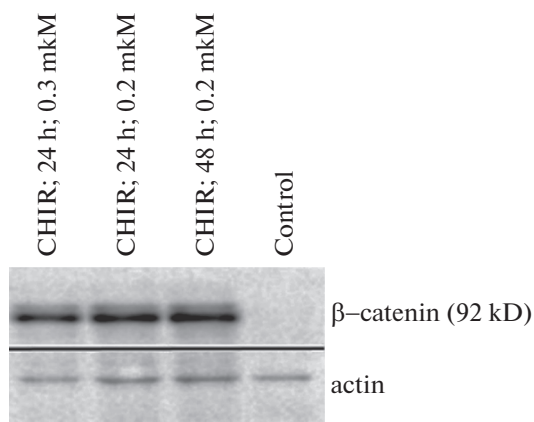


Рис. 1. Изменение количества В-катенина в клетках Namalwa при обработке CHIR. Вестерн-блот гибридизация с антителами к нефосфорилированному В-катенину. На дорожку нанесено по 10 мкг тотального клеточного белка.

тканей опухолевой природы и связано с нарушением регуляции альтернативных промоторов гена *POU2F1* (*Oct-1*) в опухолевых клетках. Так, например, в В-клеточной лимфоме Беркитта Namalwa концентрация тканеспецифичной изоформы *Oct-1L* в несколько раз выше, чем в нормальных В-клетках [4, 8].

Существование альтернативных промоторов в гене *POU2F1* (*Oct-1*) делает перспективной возможность влиять не только на экспрессию тотального *Oct-1*, но также на экспрессию отдельных его изоформ, уровень которых возрастает в опухолевых клетках.

В данной работе мы исследовали возможность избирательно влиять на экспрессию изоформ *Oct-1A* и *Oct-1L*, транскрибирующихся с альтернативных промоторов. Анализ распределения сайтов связывания в областях двух альтернативных промоторов гена *POU2F1* (*Oct-1*) показал, что транскрипция этого гена может находиться под контролем белков-мишеней для GSK3 (гликогенсинтаза киназа-3) – TCF/LEF и FOXO. В обоих промоторах присутствуют сайты связывания для транскрипционных факторов семейства TCF/LEF, через которые В-катенин заякоривается на промоторах генов-мишеней Wnt-сигнального пути, а также в промоторе L присутствуют сайты связывания для FOXO. Основываясь на анализе распределения сайтов связывания, мы предположили, что вещества, способные влиять на активность GSK3, могут избирательно влиять на активность этих промоторов.

Для фактора транскрипции *POU2F1* и GSK3 показано их участие в канцерогенезе. Однако связь GSK3 и гена *POU2F1* в регуляции канцерогенеза не изучена. Функции GSK3 в развитии опухоли неоднозначны. GSK3 может быть как су-

прессором опухолей, так и активатором опухолевого роста, в зависимости от типа опухоли. Высокий уровень GSK3 в клетке ингибирует опухолевый рост при опухолях молочной железы и при меланоме, но усиливает рост опухоли поджелудочной железы и при лейкемии.

Плейотропный эффект GSK3 связан с ее центральной ролью в разных сигнальных путях: Notch, Wnt, Hedgehog, NF- κ B [11].

Мы проверили потенциальную возможность ингибировать отдельные изоформы *Oct-1*, используя ингибитор GSK3 – CHIR – производное аминопиримидина, обладающее высоким сродством к GSK3 α основной киназе и инактивирующее ее. CHIR является активатором Wnt-сигнального пути, а одной из наиболее изученных мишеней GSK3 является В-катенин – ключевой компонент Wnt-сигнального пути. Инактивация В-катенина осуществляется активной киназой GSK3, которая фосфорилирует В-катенин, после чего он попадает в протеосомы и деградирует. Активный нефосфорилированный В-катенин взаимодействует с транскрипционными факторами семейства TCF/LEF и активирует транскрипцию генов Wnt-сигнального пути, но также В-катенин может участвовать в альтернативных путях регуляции транскрипции [12, 13].

Поскольку белок В-катенин является одним из самых изученных субстратов для GSK3, сначала мы исследовали влияние CHIR на экспрессию этого белка в клетках линии Namalwa. Нами были использованы первичные антитела, способные связывать только нефосфорилированный (транскрипционно активный) свободный В-катенин.

В данном эксперименте мы показали, что CHIR значительно увеличивает концентрацию свободного В-катенина в цитоплазме клеток лимфомы Беркитта Namalwa. Таким образом, было установлено, что CHIR, подходит для дальнейшей работы с линией клеток Namalwa. Помимо представленных на рис. 1, нами были опробованы различные концентрации CHIR: 0.6, 0.4, 0.1 и 0.05 мкМ. Минимальная концентрация CHIR достаточная для визуально определяемого повышения уровня В-катенина в клетках Namalw, составила 0.05 мкМ.

CHIR подавляет транскрипцию с тканеспецифического промотора гена *POU2F1*.

На следующем этапе нами было изучено влияние CHIR на транскрипцию с двух альтернативных промоторов гена *POU2F1* методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Для ПЦР были использованы праймеры: *Oct-1A* A-Forw 5'-tattcaaaatggcggacga-3'; *Oct-1L* L-Forw 5'-ссасссссааactgctacctgt-3'; реверсный праймер для всех изоформ Rev-A, L 5'-ctgacggattgtcattcttgagt-3'. Нами было показано, что при культивировании клеток Namalwa в течение 24 ч в среде, содержа-

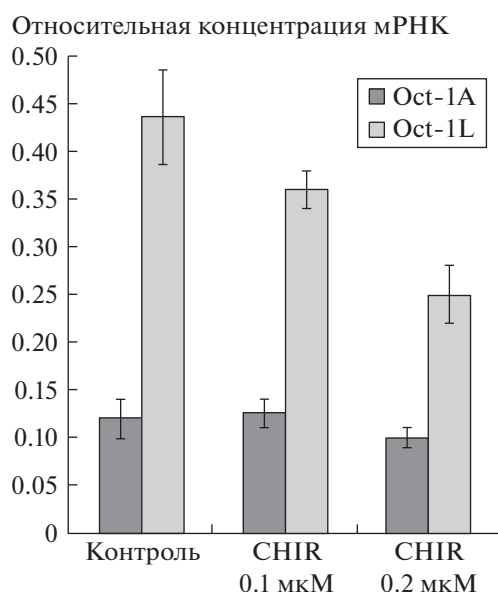


Рис. 2. Влияние CHIR на транскрипцию с альтернативных промоторов U и L гена *POU2F1* (*Oct-1*). Количественный ПЦР.

шей CHIR, количество мРНК изоформы Oct-1L, транскрибирующейся с альтернативного тканеспецифического промотора L, снижается примерно в 1.8 раза, тогда как количество мРНК убиквитарной изоформы Oct-1A не изменяется (рис. 2). Уровень снижения количества мРНК Oct-1L зависит от концентрации CHIR.

Из представленных результатов видно, что CHIR подавляет транскрипцию с промотора L (с которого транскрибируется тканеспецифическая изоформа Oct-1L), но не влияет на транскрипцию промотора U (с которого транскрибируются убиквитарная изоформа Oct-1A).

CHIR вызывает снижение количества белка Oct-1L в клетках линии Namalwa.

Одновременно мы анализировали изменение количества белка изоформ Oct-1L и Oct-1A методом Вестерн-блот гибридизации с антителами, специфичными к изоформе Oct-1L или к изоформе Oct-1A [4]. Из результатов эксперимента следует, что под действием CHIR значительно уменьшается количество изоформы Oct-1L, тогда как количество изоформы Oct-1A не изменяется (рис. 3).

Таким образом, CHIR специфически влияет на экспрессию тканеспецифической изоформы Oct-1L, значительно снижая уровень мРНК и белка Oct-1L, при этом CHIR не вызывает изменения количества мРНК и белка Oct-1A. Анализ сайтов связывания показал, что в регуляторной области промотора L присутствует несколько потенциальных сайтов связывания для белков-мишеней GSK3 – транскрипционных факторов семейств TCF и FOXO, а в промоторе U обнаружен участок связывания для TCF7L2.

CHIR считается активатором Wnt сигнального пути, так как высокоспецифично связывает GSK3, инактивируя ее, тем самым предотвращая фосфорилирование В-катенина этой киназой и его дальнейшую деградацию. Известно, что комплекс TCL-В-катенин на промоторе генов-мишеней вызывает активацию транскрипции. В обоих промоторах гена *POU2F1* есть сайты связывания для TCL, но под действием CHIR наблюдается репрессия транскрипции с тканеспецифического промотора, но одновременно не изменяется транскрипция с убиквитарного промотора. Это дает возможность предположить, что GSK3 изменяет транскрипцию с альтернативных промоторов гена *POU2F1* не через Wnt-сигнальный путь. Для подтверждения этого предположения мы использовали высокоспецифичный

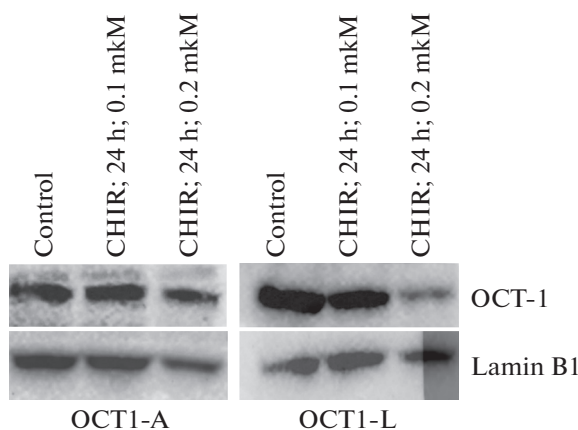


Рис. 3. Влияние CHIR на экспрессию изоформ Oct-A и Oct-L в клетках Namalwa. Вестерн-блот гибридизация с антителами к изоформе Oct-1A или Oct-1L. На дорожку нанесено по 15 мкг общего клеточного белка.

ингибитор Wnt-сигнального пути – пирвиниум. Обработка клеток Namalwa в течение 24 или 48 ч пирвиниумом в концентрации 2.2 мкМ не привела к изменению уровня транскрипции с альтернативных промоторов гена POU2F1, этот факт является подтверждением нашего предположения, что ингибитор GSK3 подавляет транскрипцию с тканеспецифического промотора гена POU2F1 не через Wnt-сигнальный путь.

Мы предполагаем, что мишенью GSK3 является FOXO, сайты связывания для которого обнаружены нами в тканеспецифичном промоторе L. Из литературных данных известно, что у человека GSK3 позитивно регулирует активность FOXO1 и стимулирует экспрессию IGF-IR [14], также показано, что у *Drosophila melanogaster* GSK3 напрямую активирует dFOXO.

Фосфорилирование белков GSK3 киназой может как позитивно, так и негативно влиять на функции белка-мишени. Фосфорилирование белков MafA, SRC-3, BCL-3 индуцирует или активацию или деградацию и изменяет их активность [9, 14, 15].

Нами было показано влияние CHIR – ингибитора GSK3 – на снижение количества мРНК и белка изоформы Oct-1L в опухолевых клетках Namalwa, и мы предполагаем, что это влияние осуществляется через FOXO. Ранее нами было показано, что в клетках лимфомы Бэркитта Namalwa уровень экспрессии этой изоформы повышен в несколько раз по сравнению с нормальными В-клетками. Полученные результаты демонстрируют, что возможно разработать систему избирательного ингибирования изоформ фактора транскрипции Oct-1 в клетках человека для подавления лекарственной устойчивости опухолевых клеток с высоким содержанием Oct-1.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herr W.S.R. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. // *Genes Dev.* 1988. V. 2(12A), P. 1513–1516. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12a.1513>
2. Stepchenko A.G. The nucleotide sequence of mouse OCT-1 cDNA. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 6. P. 1419.
3. Maddox J., Shakya A., South S., et al. Transcription Factor Oct1 Is a Somatic and Cancer Stem Cell Determinant. // *PLoS Genet.*, 2012. V. 8 (12), e1003048. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003048>
4. Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Portseva T., Mogila V.A., Georgieva S.G. Different N-terminal isoforms of Oct-1 control expression of distinct sets of genes and their high levels in Namalwa Burkitt's lymphoma cells affect a wide range of cellular processes. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44(19), P. 9218–9230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw623>
5. Stepchenko A.G., Luchina N.N., Pankratova E.V. Cysteine 50 of the POU H domain determines the range of targets recognized by POU proteins. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25 39. P. 2847–2853, 5401–5411.
6. Pankratova E.V., Deyev I.E., Zhenilo S.V., Polanovsky O.L. Tissue-specific isoforms of the ubiquitous transcription factor Oct-1 (2001) *Mol. Genet. Genom.* V. 266. № 2. P. 239–245.
7. Luchina N.N., Krivega I.V., Pankratova E.V. Human Oct-1L isoform has tissue-specific expression pattern similar to Oct-2. // *Immunol. Lett.* 2003. V. 85. P. 237–241.
8. Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Krylova I.D., Portseva TN, Georgieva SG. The regulatory interplay between Oct-1 isoforms contributes to hematopoiesis and the isoforms imbalance correlates with a malignant transformation of B cells. // *Oncotarget*, 2018. V. 9. P. 29892–29905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25648>
9. Vázquez-Arreguín K, Tantin D. The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: Old protein learns new tricks. // *Biochim Biophys Acta*, 2016. V. 1859. P. 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.02.007>
10. Qian J, Kong X, Deng N, et al. OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer. // *Gut*. 2015. V. 64 (1). P. 37–48. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306584>
11. Beurel E, Grieco SF, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. // *Pharmacol Ther.* 2015. V. 148, P. 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
12. Doumpas N, Lampart F, Robinson MD, et al. TCF/LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes. // *EMBO J*, 2019. V. 38 (2), e98873. <https://doi.org/10.15252/emboj.201798873>
13. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. // *EMBO J*. 2012. V. 31 (12). P. 2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>
14. Sakamaki J, Daitoku H, Kaneko Y, et al. GSK3 regulates gluconeogenic gene expression through HNF4 and FOXO1. // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 2012. V. 32. P. 96–101.
15. Viatour P, Dejardin E, Warnier M, et al. GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. // *Mol. Cell*. 2004. V. 16. P. 35–45.

GSK3 KINASE INHIBITOR, CHIR, SUPPRESS TRANSCRIPTION OF TISSUE SPECIFIC POU2F1 ISOFORM IN Burkitt Namalwa LYMPHOMA CELLS

**E. V. Pankratova^{a,#}, T. N. Portseva^a, A. A. Makarova^a, Academician of the RAS Yu. V. Ilyin^a,
A. G. Stepchenko^a, and Corresponding Member of RAS S. G. Georgieva^a**

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

POU2F1 (Oct-1) is a transcription factor, the overexpression of which is found in many human malignant tumors; a significant increase in its level in cells determines the malignant potential of the tumor. POU2F1 is represented in cells by several isoforms that are transcribed from alternative promoters. In Burkitt's B-cell lymphoma Namalwa, the concentration of tissue-specific isoform Oct-1L is several times higher than in normal B cells. We tested the potential to inhibit the transcription of individual Oct-1 isoforms using the GSK3 kinase inhibitor CHIR, an aminopyrimidine derivative. We have shown that CHIR specifically affects the expression of the tissue-specific isoform Oct-1L, significantly reducing the level of mRNA and Oct-1L protein, while CHIR does not change the amount of mRNA and protein of the ubiquitous isoform Oct-1A in Namalwa tumor cells. The results obtained show that it is possible to develop a system for selective inhibition of Oct-1 transcription factor isoforms in human cells to suppress drug resistance of tumor cells with a high POU2F1 content.

Keywords: transcription factor POU2F1(Oct-1), alternative promoters, GSK3 kinase

УДК 616-018, 616-092.9, 616-77

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЛАСТИКОВЫХ И ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАМЕЩЕНИИ ДЕФЕКТА НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ У ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ЦИФРОВОГО ПРОЕКТИРОВАНИЯ

© 2021 г. Ал. Ал. Долгалев¹, Д. С. Святославов², В. А. Путь^{2,3}, академик РАН И. В. Решетов^{2,3}, И. В. Кастыро^{3,4,*}

Поступило 03.10.2020 г.
После доработки 09.10.2020 г.
Принято к публикации 10.10.2020 г.

По предварительно изготовленным методами 3D-проектирования и прототипирования шаблонам в ходе эксперимента созданы дефекты бокового участка нижней челюсти баранов с использованием пьезохирургической техники. Проведено замещение дефектов пластиковыми имплантатами, полученными методом послойного наплавления FDM-печати – fusing deposition modeling и фиксации титановыми винтами к телу челюсти. Во временном интервале пластиковые имплантаты заменены титановыми, полученными по технологии селективного лазерного спекания (SLS) с использованием 3D-принтера. С целью изучения процессов репаративного остеогенеза были анализированы микропрепараты тканей периимплантационной зоны. В результате были выявлены признаки остео- и фибро-остеоинтеграции. Полученные данные расцениваются как предпосылка для дальнейших клинических испытаний разработанных протоколов последовательного замещения дефектов челюстей с использованием 3D-печати.

Ключевые слова: пьезохирургическая техника, дефект челюсти, периимплантационная зона, остеоинтеграция, репаративный остеогенез, титановый имплантат

DOI: 10.31857/S268673892101008X

ВВЕДЕНИЕ

Костные аллогенные имплантаты имеют ряд недостатков: медленная остеоинтеграция, существует риск передачи от донора к реципиенту бактерий и/или вирусов, развитие реакции гистонесовместимости и хронического гранулематозного воспаления [1–3]. Основным недостатком синтетических материалов, в отличие от ауто-, алло-

и некоторых ксенотрансплантатов, является слабая способность к остеоиндукции [4–6].

Лечение дефектов и деформаций дефектов челюстно-лицевой области строится на профилактических принципах предсказуемости и персонализации лечения [7]. Основными этапами такого лечения являются: цифровая диагностика, виртуальное планирование лечения, подбор материала для 3D-прототипирования имплантата, установка имплантата и контроль функциональной нагрузки [8]. Методы провизорной имплантации и последующего системного внедрения постоянных протезных конструкций, изготовленных из чистого титана при лечении пациентов с дефектами лицевого скелета актуальны в связи с малым количеством исследований в данной области [9].

Цель исследования: оценить эффективность последовательного применения пластиковых и титановых имплантатов при замещении дефекта нижней челюсти у животных (овцы) с помощью предварительного цифрового проектирования.

¹ ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ ЧОУ ВПО Московский университет им. С.Ю. Витте, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

*e-mail: ikastyro@gmail.com

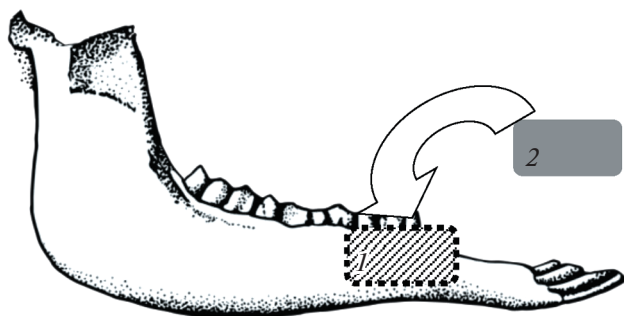


Рис. 1. Схема эксперимента. Несекционная резекция, в пределах здоровых тканей (1) в зоне имплантации пластины (2).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте были использованы 4 половозрелых овцы Северо-Кавказской мясошерстной породы в возрасте от 6 мес до 1 года с полностью сформированными корнями зубов. Масса тела животных составляла 37.6 ± 1.73 кг. Овец содержали в вольерах опытной станции Всероссийского научно-исследовательского института овцеводства и козоводства (Россия, Ставропольский край, г. Михайловск) на обычном пищевом рационе.

Протокол эксперимента включал цифровое проектирование и прототипирование в 3D-печати на пластиковых прототипах и последующее двухэтапное замещение бокового дефекта нижней челюсти животных. Под общей анестезией (внутримышечно: раствор тиопентала натрия; 50 мг/кг, 0.25% раствор дроперидола 0.2 мл/кг; 0.5% раствор диазепам, 0.2 мл/кг; 5% раствор трамадола, 1 мл) и с применением местной инфльтрационной анестезии 4% раствором артикаина с эпинефрином 1:200 000 проводилась резекция наружной кортикальной пластинки

нижней челюсти, после чего устанавливался пластиковый имплантат, изготовленный по цифровому прототипу (рис. 1).

До операции под общим наркозом проводили мультиспиральную компьютерную томографию нижней челюсти, с помощью индивидуальных ложек делали оттиски зубных рядов, изготавливались гипсовые модели, которые затем сканировались с помощью внеротового сканера и экспортировались в программу "Implant-Assistent" для моделирования цифрового прототипа имплантата, который накладывали на 3D-реконструкцию зубного ряда, полученного с помощью компьютерной томографии. Далее моделировался хирургический цифровой прототип с учетом состояния будущего костного ложа. Компьютерный проект распечатывался на 3D-принтерах в виде пластикового и титанового имплантатов (рис. 2).

Экспериментальную часть исследования по установке имплантатов проводили в условиях отделения экспериментальной медицины Ставропольского государственного медицинского университета. Опыты производили в соответствии с положением приказа № 775 МЗ СССР от 12.08.77 г., и с правилами лабораторной практики Российской Федерации № 267 от 2003 г. и стандартом GLP.

Имплантацию пластиковых пластин осуществляли через наружный разрез в поднижнечелюстной области справа длиной 6–7 см после удаления фрагмента наружной кортикальной пластинки в подготовленное ложе. Через 1, 3, 6 мес проводилось удаление пластикового имплантата с одномоментной установкой титанового. Вокруг пластиковой пластины с забором окружающих тканей выполнялся пропил. В ложе устанавливался титановый имплантат. В обоих случаях фиксация имплантатов осуществлялась с помощью винтов для фиксации костных пластин, мягкие ткани послойно ушивали резорбируемым

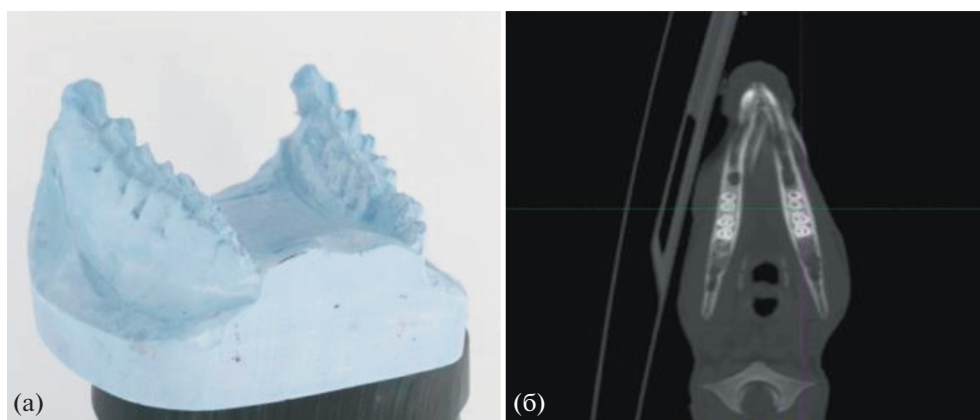


Рис. 2. Вид гипсовой модели нижней челюсти (а), компьютерная томография нижней челюсти подопытного животного (б).

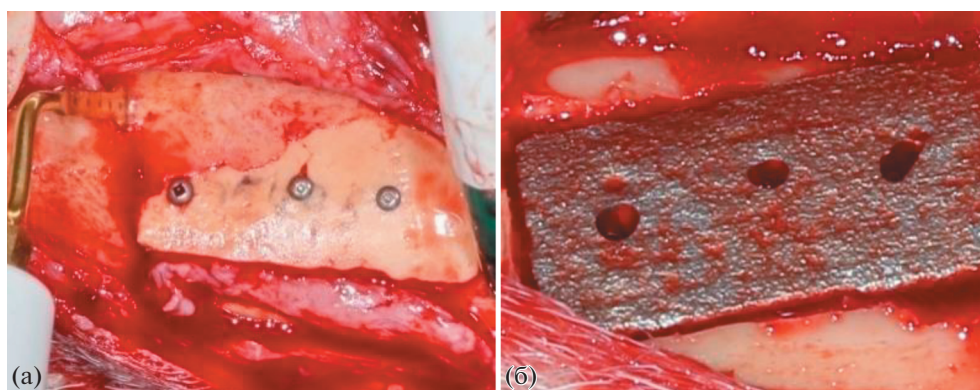


Рис. 3. Вид пластикового (а) и титанового (б) имплантатов через 3 мес после установки.

материалом, кожу ушивали нерезорбируемым материалом. Овец начинали кормить мягкой пищей через сутки. Швы снимали на десятые сутки после операции.

Забор материала для морфологических методов исследования проводили с помощью остеотомов, дисковой пилы, костных кусачек через 1, 3 и 6 мес при замене пластикового имплантата на титановый и при выведении животных из эксперимента через 1, 3 и 6 мес после установки титанового имплантата. Фрагменты кости фиксировали в 10% растворе забуференного нейтрального формалина в течение 10 дней, а после проводили декальцинацию. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, толуидиновым синим, по Маллори в модификации Гейденгайна, проводили ШИК-реакцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении оценки соответствия разработанного протокола поставленной цели исследования на пластиковых прототипах и изготовлении шаблонов предстоящей операции выявлена следующая особенность. Для крупных животных изготовление шаблонов, устанавливаемых в полости рта, не имеет смысла, так как при внесении любого инородного тела в полость рта у животного возникает непроизвольный жевательно-глотательный рефлекс. Таким образом, пластиковый шаблон для данного вида животного, используемый во рту, не эффективен.

Макроскопически в области *пластиковой пластины* признаков воспаления не было. На границе соприкосновения кости с краем имплантата местами костная ткань выросла на поверхность пластины, а местами определялась тонкая полоска мягких тканей (рис. 3а). Латеральные края *титановых имплантатов* были плотно фиксированы к костной ткани, ячейки имплантата заполнены костной тканью, краевые зоны были плотно

сращены с костной и окружающей фиброзной-мышечной тканью, гранулематозной ткани не было (рис. 3б).

Во всех случаях микроскопически определялись губчатая кость с неравномерно утолщенной надкостницей и кортикальным слоем, участки лакунарной резорбции костных балок, в костномозговых ячейках определялся красный костный мозг. В периимплантационной зоне — слой плотной фиброзной ткани с фибробластами и формированием волокнистых структур с трабекулярным строением незрелой костной ткани с петливой структурой, слой формирующихся костных балочек с большим количеством остеобластов по их периферии. Процесс перестройки незрелой кости происходил активно. По краям новых костных трабекул выявлялись остеокласты.

Во всех 4 случаях непосредственный контакт костной ткани с титановым имплантатом установлен хорошо, что свидетельствует о хорошем процессе остеоинтеграции. Имелись участки реорганизации тканей нижней челюсти на поверхности раздела имплантат/кость с признаками фиброзно-костной интеграции. В других работах также было показано, что титановые имплантаты не только по своей структуре, но и по физико-механическим свойствам близки к костным тканям — они имеют трабекулярную структуру, сходную со структурой кости [10, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Последовательное применение пластиковых и титановых имплантатов, изготовленных методами 3D-печати после предварительного цифрового моделирования, вызвало нормальную остео- и фиброинтеграцию тканей с имплантируемым материалом. Такой подход можно использовать в клинической практике у пациентов для замещения хирургических дефектов нижней челюсти. Предварительное моделирование имплантатов позволяет достичь прогнозируемого результата

хирургического вмешательства и оценить возможности и перспективы приживаемости имплантата.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barchenko G. N.* Application of artificial calcium-phosphate biomaterials in traumatology and orthopedics], *Sbornic rabot Vserossijskoj nauchno-prakticheskoi konferencii* [Collection of works of the All-Russian Scientific and Practical Conference], Moscow. 2010: 3–5 (in Russian).
2. *Meyer U., Joos U., Wiesmann H.P.* Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III // *Int. J. Oral. Maxillofac Surg.* 2004. V. 7. P. 635–641.
3. *Urist M. R.* Bone: formation by autoinduction // *Science.* 1965. V. 150. P. 893–899.
4. *Antonov E. N.* Atomic force microscopic study of the surface morphology of apatite films deposited by pulsed laser ablation // *Biomaterials.* 1997. V. 15. P. 1043–1049.
5. *Qu S. X.* Evaluation of the expression of collagen type I in porous calcium phosphate ceramics implanted in an extraosseous site // *Biomaterials.* 2004. V. 25. P. 659–661.
6. *Seeherman H. J.* Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a non-human primate model // *J Bone Joint Surg.* 2004. V. 86-A. P. 1961–1972.
7. *Karpyuk V.B., Perova M.D., Porkhanov V.A., Reshetov I.V., Gilevich I.V., Sevostyanov I.A.* The use of the stromal-vascular fraction of adipose tissue in regenerative surgery of the alveolar ridge // *Golova i sheya. Rossijskij zhurnal Head and neck Russian Journal.* 2019. V. 7 (4). P. 18–26 (in Russian).
8. *Reshetov I.V., Samoilova S.I., Sukortseva N.S., Gaboyan A.G., Svyatoslavov D.S., Put V.A., Kudrin K.G.* *In vivo* modeling of a prefabricated cartilaginous autograft for reconstruction of the auricle in an experiment // *Golova i sheya. Rossijskij zhurnal Head and neck Russian Journal.* 2020. V. 8 (1). P. 8–14 (in Russian).
9. *Dolgolev A., Reshetov I., Svyatoslavov D., Sinelnikov M., Kudrin K., Dub V., Put V., Anikin V.* Experimental Bio-integration of a Titanium Implant in Delayed Mandibular Reconstruction // *J. Pers. Med.* 2020. V. 10 (1). P. 6. <https://doi.org/10.3390/jpm10010006>
10. *Medlin D.J., Charlebois S., Swartz D., Shetty R.* Metalurgical characterization of a porous tantalum biovascular (trabecular metal) for orthopedic implant applications // *Advanced materials and processing.* 2003. V. 31. P. 32.
11. *Fratzl P.* Structure and mechanical quality of the collagen – mineral nano-composite in bone // *J Mater Chem.* 2004. V. 14. P. 2115–2123.

THE EFFECTIVENESS OF THE SEQUENTIAL USE OF PLASTIC AND TITANIUM IMPLANTS FOR EXPERIMENTAL REPLACEMENT OF THE MANDIBULAR DEFECT IN ANIMALS USING PRELIMINARY DIGITAL DESIGN

**Al. Al. Dolgalev^a, D. S. Svyatoslavov^b, V. A. Pout^{b,c},
Academician of the RAS I. V. Reshetov^{b,c}, and I. V. Kastyro^{c,d,#}**

^a *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Stavropol State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian, Stavropol, Russian Federation*

^b *Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

^c *Moscow S.U. Witte University, Moscow, Russian Federation*

^d *People’s Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation*

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

According to the pre-made methods of 3D design and prototyping of templates, defects were created in the lateral area of the lower jaw of rams using the piezosurgical technique. The defects were replaced by plastic implants obtained by the method of layer-by-layer fusion of the FDM printing - fusing deposition modeling and fixation with titanium screws to the jaw body. In the time interval, plastic implants are replaced by titanium implants, obtained by the technology of selective laser sintering (SLS) using a 3D printer. To study the processes of reparative osteogenesis, microsamples of tissues of the preimplantation zone were analyzed. As a result, signs of osteo- and fibro-osseointegration were identified. The obtained data are regarded as a prerequisite for further clinical trials of the developed protocols for the sequential replacement of jaw defects using 3D printing.

Keywords: piezosurgical technique, jaw defect, peri-implantation zone, osseointegration, reparative osteogenesis, titanium implant

УДК 577.1:597.552.5

РАЗЛИЧИЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПАУКОВ-КРУГОПРЯДОВ, ОБИТАЮЩИХ В ПРИБРЕЖЬЕ ОЗЕРА И В СТЕПИ, ОБУСЛОВЛЕННЫ ПОТРЕБЛЕНИЕМ РАЗНЫХ ТАКСОНОВ ИМАГО ХИРОНОМИД

© 2021 г. Н. Н. Сущик^{1,2,*}, Е. В. Борисова², И. А. Дёмина (Витковская)²,
О. Н. Махутова^{1,2}, член-корреспондент РАН М. И. Гладышев^{1,2}

Поступило 25.09.2020 г.

После доработки 09.10.2020 г.

Принято к публикации 09.10.2020 г.

Амфибионтные насекомые, хирономиды рр. *Glyptotendipes* и *Chironomus*, вылетающие из соленого оз. Ши́ра, различались по составу и содержанию жирных кислот, включая незаменимую эйкозапентаеновую кислоту (20:5n-3, ЭПК), и при вылете концентрировались на разных территориях: побережье и удаленные аридные степные участки соответственно. Потенциальные потребители имаго хирономид – пауки-кругопряды *Larinoidea suspicax*, обитавшие в побережье и степи, также различались по жирнокислотному составу. При этом основные различия были обусловлены более высоким уровнем ЭПК у обитателей прибрежного биотопа, вероятно, за счет потребления имаго хирономид р. *Glyptotendipes*, богатых этой кислотой и разлетававшихся лишь в пределах данного биотопа. Повышенное содержание дефицитной в наземных экосистемах ЭПК у пауков-кругопрядов побережья соленого озера потенциально может способствовать их успешному выживанию в аридном ландшафте.

Ключевые слова: вылет амфибионтных насекомых, *Glyptotendipes*, *Chironomus*, *Larinoidea suspicax*, жирнокислотный состав, эйкозапентаеновая кислота, перенос веществ между экосистемами

DOI: 10.31857/S2686738921010236

Вылет амфибионтных насекомых из континентальных водоемов поставляет на сушу органические вещества, имеющие особенное значение для функционирования наземных экосистем в малопродуктивных аридных ландшафтах [1]. Амфибионтные насекомые, на личиночных стадиях включенные в водные трофические сети, выносят на сушу значительные количества длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот семейства омега-3 (ПНЖК), прежде всего эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК, 20:5n-3), представляющих собой незаменимые компоненты питания многих водных и наземных животных [2].

Однако многие амфибионтные насекомые, например, хирономиды (сем. Chironomidae, отр. Diptera), после вылета не преодолевают большие

расстояния, а концентрируются в узкой прибрежной полосе [3]. В связи с этим можно полагать, что наземные консументы, населяющие побережье и отдаленные от водных объектов участки, имеют разный доступ к пище водного происхождения. Поскольку амфибионтные насекомые содержат ПНЖК, дефицитные в наземных экосистемах [2], вероятно, что их наземные консументы, обитающие в зоне и вне зоны вылета, могут различаться как по численности, так и по физиолого-биохимическому статусу.

Ранее нами при изучении соленого озера Ши́ра, расположенного в аридном степном ландшафте (Республика Хакасия, 54°30' с.ш., 90°10' в.д.), было установлено, что две доминирующих в бентосе таксономических группы хирономид при вылете по-разному распределяются на суше: представители р. *Glyptotendipes* концентрируются преимущественно в 50-метровой прибрежной полосе, тогда как имаго р. *Chironomus* роятся на степных возвышенных участках, удаленных от берега озера на 100 и более метров [4, 5]. Одной из групп наземных потребителей имаго хирономид являются пауки-кругопряды (сем. Araneidae, отр. Araneae) [6]. В сообществе травостоя пауков побережья оз. Ши́ра доминировал паук-кругопряд

¹ Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

² Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

*e-mail: labehe@ibp.ru

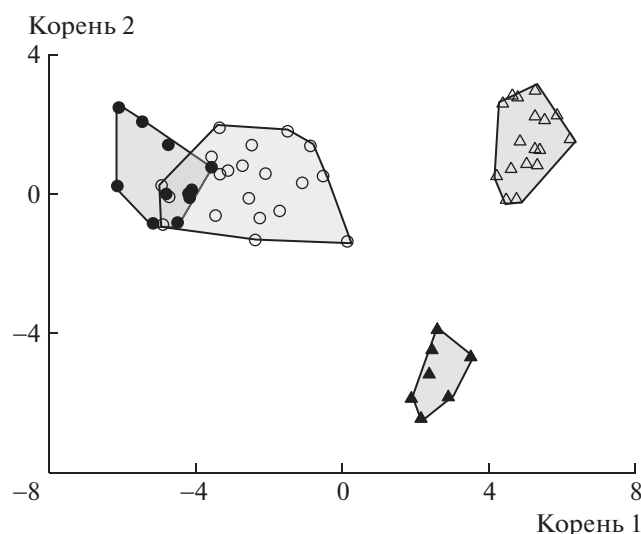


Рис. 1. Результаты дискриминантного анализа содержания жирных кислот (% от суммы ЖК) в биомассе наземных и амфибионтных животных, обитавших близ озера Ши́ра, Хакасия, май–август 2016–2019 гг. Незакрашенные кружки – пауки *Larinioides suspicax*, собранные в пределах 50 м от берега озера, закрашенные кружки – пауки *L. suspicax*, собранные в степи на удалении 300–400 м от берега озера, незакрашенные треугольники – имаго хирономид р. *Glyptotendipes*, собранные в пределах 50 м от берега озера, закрашенные треугольники – имаго хирономид р. *Chironomus*, собранные в степи на удалении 300–400 м от берега озера.

Larinioides suspicax (O. Pickard-Cambridge, 1876); особи этого вида также встречались и на отдаленных степных участках.

Целью работы было проверить, влияет ли местообитание на жирнокислотный состав пауков *L. suspicax*, и происходит ли накопление незаменимой ЭПК в их биомассе за счет потребления имаго хирономид.

В течение нескольких вегетационных сезонов (май–август 2016–2019 гг.) выполнены сборы имаго хирономид *Glyptotendipes* в 50-метровой прибрежной полосе оз. Ши́ра с помощью энтомологического сачка и имаго *Chironomus* на удалении 300–400 м от берега озера привлечением на свет. На тех же участках вручную собраны взрослые особи пауков-кругопрядов *L. suspicax*. Анализ жирных кислот (ЖК) амфибионтных и наземных животных проводили методом хромато-масс-спектрометрии, описанном ранее [7, 8]. Расчеты средних и стандартных ошибок, *t*-критерия Стьюдента и дискриминантный анализ выполнены с использованием пакета Statistica 9.0 (StatSoft Inc.).

Хирономиды *Glyptotendipes* характеризовались достоверно большими процентными уровнями (от суммы ЖК) 18:0, 18:1n-9, 18:3n-3, 20:5n-3, 20:0, 20:1 и 20:5n-3, а также большим содержанием

ЭПК на единицу сырой массы, по сравнению с таковыми р. *Chironomus* (табл. 1). В свою очередь, имаго *Chironomus* имели более высокие процентные уровни кислот 14:0, 15:0, 16:1n-7, 17:0, 17:1n-8, 18:2n-6, 18:3n-6, 20:4n-6, а также большее суммарное содержание ЖК на единицу массы. Пауки *L. suspicax* прибрежья содержали достоверно больше 16:1n-7, 16:2n-4, 17:0, 18:1n-7, 18:4n-3, 20:0, 20:1 и 20:5n-3, по сравнению с особями, обитавшими на отдаленных от берега степных участках (табл. 1).

Мультивариантный дискриминантный анализ позволил выявить те кислоты, которые вносили наибольший вклад в общие различия ЖК составов имаго двух изученных родов хирономид и пауков из разных местообитаний (рис. 1, табл. 2). Максимальные различия по корню 1 были между хирономидами *Glyptotendipes*, роившимися в прибрежье, и пауками *L. suspicax*, обитавшими в степи, вследствие отличий в уровнях 20:5n-3 и 18:4n-3 – маркёров органического вещества, синтезируемого некоторыми водорослями, с одной стороны, и 18:0, синтезируемой всеми животными, с другой стороны (табл. 2). Второй корень выявил наибольшие различия между каноническими средними для *Chironomus* и *Glyptotendipes* за счет различия в уровнях 18:3n-6 (маркёр питания зелеными водорослями на личиночных стадиях) и 20:5n-3 (маркёр питания диатомовыми и криптофитовыми водорослями на личиночных стадиях) (табл. 2). Значительные различия ЖК состава хирономид двух изученных таксонов, разлетавшихся на разные территории, отмечены нами и ранее при сравнении особей на стадиях личинки [7], и были связаны с приуроченностью личинок *Chironomus* и *Glyptotendipes* к разным биотопам озера [9].

Основные различия жирнокислотного состава пауков *L. suspicax* были обусловлены более высоким уровнем 20:5n-3 у обитателей прибрежного биотопа, по сравнению с таковым у степных особей (табл. 1, 2, рис. 1). Высокий уровень незаменимой ЭПК у пауков прибрежья, очевидно, был связан с потреблением хирономид *Glyptotendipes*, разлетавшихся лишь в пределах 50 м. Пауки, обитавшие в степи, могли ловить и потреблять только имаго *Chironomus* с достоверно меньшим содержанием незаменимой ЭПК (табл. 1).

Важно отметить, что ЖК состав пауков не являлся простым отображением состава их пищи. Например, имаго *Chironomus*, потенциально доступные для пауков степи, имели достоверно большие уровни омега-6 ПНЖК (18:2n-6, 18:3n-6, 20:4n-6), по сравнению с таковыми у *Glyptotendipes*, однако, уровни этих кислот в биомассе пауков из сравниваемых местообитаний достоверно не отличались (табл. 1). Вероятно, омега-6 ПНЖК, содержащиеся в значительных количествах в ор-

Таблица 1. Содержание жирных кислот (% от суммы или мг/г сырой массы, среднее значение ± стандартная ошибка) в биомассе наземных и амфибионтных животных, отловленных близ озера Шира, Хакасия, май–август 2016–2019 гг. Величины имели нормальное распределение (согласно критерия Колмогорова–Смирнова) и сравнивались с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистически достоверные значения *t* (*p* < 0.05) приведены жирным шрифтом, *n* – число проб

ЖК	Пауки <i>L. suspicax</i> (1)	Пауки <i>L. suspicax</i> (2)	<i>t</i> _{1–2}	Хирономиды <i>Glyptotendipes</i> (3)	Хирономиды <i>Chironomus</i> (4)	<i>t</i> _{3–4}
	прибрежье, <i>n</i> = 20	степь, <i>n</i> = 11		прибрежье, <i>n</i> = 17	степь, <i>n</i> = 8	
%						
12:0	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.27	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.28
14:0	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.4	0.44	1.3 ± 0.1	3.0 ± 0.3	5.96
i15:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.16	0.2 ± 0.0	1.0 ± 0.2	4.35
15:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.36	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.1	5.29
16:0	11.4 ± 0.5	11.9 ± 0.7	0.57	15.9 ± 0.4	16.8 ± 0.7	1.12
16:1n-9	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.45	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.07
16:1n-7	3.9 ± 0.6	2.4 ± 0.2	2.55	4.4 ± 0.5	9.1 ± 1.0	4.24
i17:0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	1.73	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.1	2.26
16:2n-4	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.85	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.03
17:0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.0	2.77	0.8 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.40
17:1n-8	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.07	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	7.38
18:0	11.8 ± 0.7	10.1 ± 0.7	1.77	7.9 ± 0.2	5.8 ± 0.5	3.81
18:1n-9	19.6 ± 1.0	24.6 ± 1.6	2.63	8.3 ± 0.2	6.8 ± 0.4	3.09
18:1n-7	6.8 ± 0.6	4.0 ± 0.4	4.01	7.5 ± 0.1	7.2 ± 0.2	1.29
18:2n-6	19.7 ± 1.0	19.9 ± 0.6	0.24	15.0 ± 0.6	18.6 ± 1.4	2.36
18:3n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.23	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	4.97
18:3n-3	5.1 ± 0.4	8.4 ± 1.2	2.50	11.1 ± 0.1	7.0 ± 1.6	2.57
18:4n-3	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.26	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.71
20:0	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	3.01	1.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	4.85
Σ20:1	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.54	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.1	2.31
20:4n-6	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.5	0.17	1.7 ± 0.0	2.9 ± 0.3	4.68
20:5n-3	9.6 ± 0.6	6.8 ± 0.6	3.10	17.4 ± 0.6	7.5 ± 0.7	10.63
мг/г						
20:5n-3	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.51	3.1 ± 0.2	1.9 ± 0.2	4.04
Сумма ЖК	22.4 ± 1.8	27.4 ± 3.2	1.38	18.5 ± 1.6	25.1 ± 2.3	2.35

ганическом веществе наземного происхождения [10], в избытке поступали из доступных пищевых источников и поддерживались в биомассе пауков на некотором оптимальном уровне. Напротив, ЭПК, недостаток которой в пище может лимитировать рост и развитие многих наземных животных [11], накапливалась в биомассе пауков при наличии соответствующего пищевого источника – имаго *Glyptotendipes*.

Следует отметить, что у пауков иных таксонов отр. Agapeae, обитающих в прибрежье различных озер и рек, также были обнаружены повышенные уровни незаменимой ЭПК, по сравнению с пауками, населяющими отдаленные от воды участки [12, 13]. При этом доказано положительное влия-

ние повышенного уровня ЭПК в биомассе на физиологическое состояние (иммунный статус) пауков [12].

Таким образом, согласно нашим данным, дефицитная омега-3 ЭПК преимущественно накапливалась в биомассе изученного вида пауков, как это отмечено для других консументов [12, 13], тогда как имеющиеся в пище в избытке омега-6 ПНЖК консервативно поддерживались на одном уровне.

В результате, на примере пауков-кругопрядов *L. suspicax*, впервые обнаружены достоверные различия в жирнокислотном составе консументов, обитающих в прибрежной полосе соленого озера аридного ландшафта и в степи. Обнаружен-

Таблица 2. Результаты дискриминантного анализа процентных уровней жирных кислот (% от суммы ЖК) у наземных и амфибионтных животных, отловленных близ озера Ши́ра, Хакасия, май–август 2016–2019 гг.

Характеристики канонических переменных; предмет анализа: таксоны, жирные кислоты	Корень 1	Корень 2
Канонический <i>R</i>	0.972	0.906
χ^2 -квадрат	244	113
Степень свободы	39	24
<i>P</i>	0.000000	0.000000
Канонические средние		
пауки <i>L. suspicax</i> , побережье	–2.55	0.27
пауки <i>L. suspicax</i> , степь	–4.80	0.47
хинономиды <i>Glyptotendipes</i> , побережье	5.05	1.53
хинономиды <i>Chironomus</i> , степь	2.55	–5.20
Коэффициенты структурных факторов		
14:0	–0.01	–0.28
16:0	0.25	–0.17
16:1n-7	0.11	–0.34
i17:0	0.11	–0.28
17:0	0.12	–0.26
17:1n-8	0.10	–0.65
18:0	–0.18	0.22
18:1n-7	0.15	–0.01
18:2n-6	–0.15	–0.13
18:3n-6	–0.01	–0.43
18:3n-3	0.16	0.15
18:4n-3	0.34	0.03
20:5n-3	0.36	0.44

Примечание: в анализе использованы только жирные кислоты с нормальным распределением; кислоты $\Sigma 14:1$, 20:0, $\Sigma 20:1$, 20:4n-6, 22:0 были автоматически исключены из модели в ходе пошаговой процедуры.

ные различия в первую очередь были обусловлены более высоким уровнем незаменимой ЭПК у обитателей прибрежного биотопа, который обеспечивался наличием ее значительного пищевого источника: вылетающих из озера хинономид р. *Glyptotendipes*.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантами РФФИ 19-34-90099, 20-04-00346а и Государственными заданиями в рамках программы фундаментальных исследований РФ, темы № 51.1.1 и № FSRZ-2020-0006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Millan A., Velasco J., Gutierrez-Canovas C., et al. // Journal of Arid Environments. 2011. V. 75. P. 1352–1359.
2. Gladyshev M.I., Gladysheva E.E., Sushchik N.N. // Ecological Complexity. 2019. V. 38. P. 140–145.
3. Muehlbauer J.D., Collins S.F., Doyle M.W., et al. // Ecology. 2014. V. 95. P. 44–55.
4. Борисова Е.В., Толмеев А.П., Дроботов А.В., и др. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2019. Т. 12 (№ 2). С. 196–215.
5. Витковская И.А., Борисова Е.В., Сущик Н.Н. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2019. Т. 12(№ 2). С. 216–226.
6. Sanchez-Ruiz J.A., Phillips J.S., Ives A.R., et al. // Polar Biol. 2018. V. 41. P. 1547–1554.
7. Makhutova O.N., Borisova E.V., Shulepina S.P., et al. // Contemporary Problems of Ecology. 2017. V. 10 (№ 3). P. 230–239.
8. Gladyshev M.I., Anishchenko O.V., Makhutova O.N., et al. // Journal of Food Composition and Analysis. 2020. V. 90. P. 103489.
9. Толмеев А.П., Шулепина С.П., Махутова О.Н., и др. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2018. Т. 11 (№ 4). С. 367–383.

10. Fontaneto D., Tommaseo-Ponzetta M., Galli C., et al. // Ecology of Food and Nutrition. 2011. V. 50. P. 351–367.
11. Twining C.W., Brenna J.T., Hairston N.G. Jr., et al. // Oikos. 2015. V. 125. P. 749–760.
12. Fritz K.A., Kirschman L.J., McCay S.D., et al. // Freshwater Science. 2017. V. 3. P. 893–900.
13. Chari L.D., Richoux N.B., Moyo S., et al. // Food Webs. 2020. V. 24. P. e00152.

DIFFERENCES IN FATTY ACID COMPOSITION BETWEEN ORB-WEAVER SPIDERS INHABITED A RIPARIAN ZONE AND A STEPPE ARE ASSOCIATED WITH THE CONSUMPTION OF DIFFERENT CHIRONOMID TAXA

N. N. Sushchik^{a,b,#}, E. V. Borisova^b, I. A. Demina (Vitkovskaya)^b,
O. N. Makhutova^{a,b}, and Corresponding Member of RAS M. I. Gladyshev^{a,b}

^a Institute of Biophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

[#]e-mail: labehe@ibp.ru

Amphibiotic insects, chironomids of *Glyptotendipes* and *Chironomus* genera, that emerged from saline Lake Shira differed in composition and content of fatty acids, including the essential eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA), and upon flying out they were concentrated in different territories, the riparian zone and remote arid steppe zone, respectively. Potential consumers of chironomids adults, the orb-weaver spiders *Larinoidea suspicax*, which inhabited both zones, also differed in fatty acid composition. The main difference in their biochemical composition was a significantly higher level of EPA in spiders from the riparian zone that likely to be explained by consumption of the *Glyptotendipes* adults enriched in this fatty acid and concentrated only within this zone. The higher level of EPA, which is deficient in terrestrial ecosystems, in orb-weaver spiders from the riparian zone of the saline lake may potentially promote a successful survival of the consumers in the arid landscape.

Keywords: Emergence of amphibiotic insects, *Glyptotendipes*, *Chironomus*, *Larinoidea suspicax*, fatty acid composition, eicosapentaenoic acid, transfer of matter between ecosystems

УДК 578

ТЕРМОВАКЦИНАЦИЯ – ТЕРМОГЕЛИОКС КАК СТИМУЛЯТОР ИММУННОГО ОТВЕТА. КИНЕТИКА СИНТЕЗА АНТИТЕЛ И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА ПРИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2021 г. Член-корреспондент РАН С. Д. Варфоломеев^{1,5}, С. В. Журавель², А. А. Панин³, Л. В. Шогенова⁴, В. И. Быков⁵, С. Б. Цыбенкова^{5,*}, А. М. Рябокони^{5,6}, И. И. Уткина², П. В. Гаврилов², А. Г. Чучалин⁴

Поступило 06.10.2020 г.

После доработки 15.10.2020 г.

Принято к публикации 16.10.2020 г.

Показана высокая эффективность использования термогелиокса (ингаляции высокотемпературной смесью гелия и кислорода) при лечении пациентов, пораженных COVID-19. Экспериментально исследована динамика накопления IgG, IgM и С-реактивного белка (СРБ) у больных с коронавирусной инфекцией в “рабочей” и контрольной группах. Показано, что термогелиокс интенсифицирует синтез антител IgG, IgM и СРБ, при этом элиминирует период индукции на кинетических кривых синтеза специфических антител в форме IgG и переводит в быструю фазу синтез СРБ. Результаты эксперимента подтверждают полученные ранее данные на основе анализа кинетической модели развития коронавирусной инфекции в организме человека.

Ключевые слова: коронавирус, кинетическая модель, термогелиокс, иммуноглобулин G, иммуноглобулин M, С-реактивный белок, термовакцинация

DOI: 10.31857/S2686738921010248

Борьба с коронавирусной инфекцией – чрезвычайно острая проблема, требующая разработки новых методов, расширяющих диапазон возможностей современной терапии и профилактики [1]. Применяемые в настоящее время противовирусные и общеукрепляющие терапевтические средства зачастую недостаточно эффективны и приводят к глубокому поражению многих систем организма и часто к смерти пациента [2]. Большие надежды возлагаются на создание синтетических вакцин,

действующих на уровне синтеза антител, специфически взаимодействующих с теми или иными белками вируса.

Нами разработана новая методика борьбы с коронавирусным поражением организма, основанная на использовании термогелиокса (ингаляции высокотемпературной смесью гелия и кислорода). Проведены клинические испытания на базе отделения реанимации и интенсивной терапии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. В клинику поступали пациенты средней и высокой тяжести поражения коронавирусом (20–50% поражения легких). Подавляющее большинство больных имеют сопутствующие заболевания: артериальная гипертензия различной степени, хронический обструктивный бронхит, ХОБЛ, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз нижних конечностей, бронхиальная астма, язвенная болезнь желудка и др. Результаты клинических испытаний в высшей степени положительны. Как правило, на 2–3-и сутки использования термогелиокса с применением медицинского аппарата “Гелиокс-экстрим” (ООО “Медтехинновации”) у пациента не обнаруживается вирус, определяемый по стандартной методике полимеразной цепной реакции (ПЦР), и возникает устойчивый антительный ответ. Эти эффекты были предсказаны на основе кинетической модели, включаю-

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт физико-химических основ функционирования сети нейронов и искусственного интеллекта, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

³ ООО “Медтехинновации”, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁵ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

⁶ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

*e-mail: s.tsybenova@gmail.com

Количество ПЦР положительных тестов РНК коронавируса COVID-19, %

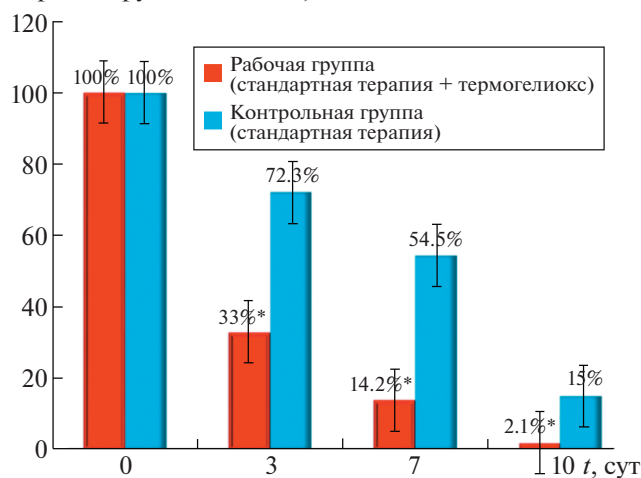


Рис. 1. Количество ПЦР положительных тестов в контрольной и “рабочей” группах (* $p \leq 0.05$).

шей динамику роста и размножения вируса в организме, динамику поражения вирусом клеток-реципиентов, эффекты термодеструкции вирусов и динамику антительного ответа. Теоретический анализ предсказывает потенциальные эффекты термовакцинации – выработку антител на белки разрушенных вирусных частиц [3–5].

На основе изучения белкового состава конденсата выдыхаемого воздуха пациента показана безопасность применения термогелиокса [6, 7]. Нами проведено экспериментальное исследование кинетики накопления специфических антител (IgG, IgM) у пациентов, пораженных коронавирусом. В исследование были включены 60 пациентов с COVID-19, поделенные на две равные группы. В первую (“рабочую”) группу ($N = 30$) вошли пациенты, которым в стандартный протокол лечения COVID-19 была включена терапия термогелиоксом, во вторую (контрольную) группу 2 ($N = 30$) – пациенты, получавшие стандартную терапию согласно временным методическим рекомендациям Минздрава России.

Из 60 пациентов, включенных в исследование, 28 (46.7%) были медицинскими работниками. В “рабочей” группе соотношение мужчины/женщины – 17/13, а в контрольной группе – 16/14 соответственно. В обеих группах пациенты были сопоставимы по полу, $p = 0,403$ – точный критерий Фишера. Средний возраст пациентов в исследовании составлял 56.7 года (45 лет; 61 год). При этом в “рабочей” группе – 58 лет (45 лет; 59.5 года), а в контрольной – 55 лет (46 лет; 66 лет). Пациенты были сопоставимы по возрасту, $p = 0.537$ (критерий Манна–Уитни). Объем поражения легких на момент включения в исследование составлял: в “рабочей” группе – 25.2% (21%, 42.5%), в кон-

трольной – 26% (25%, 41.7%). При этом средняя длительность заболевания в “рабочей” группе составляла 2 дня (1 и 4), в контрольной – 3 дня (1 и 5). Общая характеристика клинических симптомов пациентов обеих групп включала в себя: ощущение потери обоняния и вкуса, насморк, чувство нехватки воздуха, одышку, слабость, повышение температуры, головную боль, боль в мышцах и в горле, сухой кашель.

Лечение пневмонии, вызванной вирусом SARS – CoV 2, проводили всем пациентам, включенным в протокол исследования № 11–20 от 20.04.2020, одобренный этическим комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, в период с 21 апреля по июнь 2020 года включительно.

Всем пациентам проводили забор мазка со слизистой полости носа и ротоглотки для выявления РНК коронавируса SARSCoV-2 методом ПЦР (детектирующий амплификатор CFX-96 “REAL TIME” (Bio-Rad, США)) [8–10]; компьютерная томография (КТ) легких [11]; забор венозной крови для анализа содержания иммуноглобулинов IgG (п/кол.) и IgM (п/кол.) к шиповому S-белку поверхности коронавируса SARS-CoV-2 по стандартной методике иммуноферментного анализа (ИФА) (иммунохемилюминесцентный анализатор, Mindray 6000, США) [10]. ИФА-тестирование на наличие IgG помогает детектировать контакт иммунной системы организма с вирусом, если с момента заражения прошло 2 нед.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного пакета SPSS 17.0 (SPSS Inc., USA). Использовались методы непараметрической статистики с применением U-критерия Манна–Уитни (сравнение 2 независимых переменных), точный критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

На рис. 1 представлена динамика изменения количества пациентов в контрольной и “рабочей” группах с положительным тестом РНК коронавируса SARSCoV-2 по времени. В “рабочей” группе отмечалось статистически достоверное снижение количества пациентов с положительным тестом РНК коронавируса SARSCoV-2. По нашим наблюдениям, в “рабочей” группе больных COVID-19, получавшей ингаляции термогелиоксом, отрицательный результат ПЦР определялся на третий день, а у некоторых больных отрицательный результат определялся уже в первые сутки после начала терапии. На фоне стандартной терапии в контрольной группе положительная реакция на РНК коронавируса выявлялась от семи дней до четырех недель с начала заболевания, в отдельных случаях и дольше (рис. 1).

Полученные результаты демонстрируют, что использование термогелиокса эффективно сти-

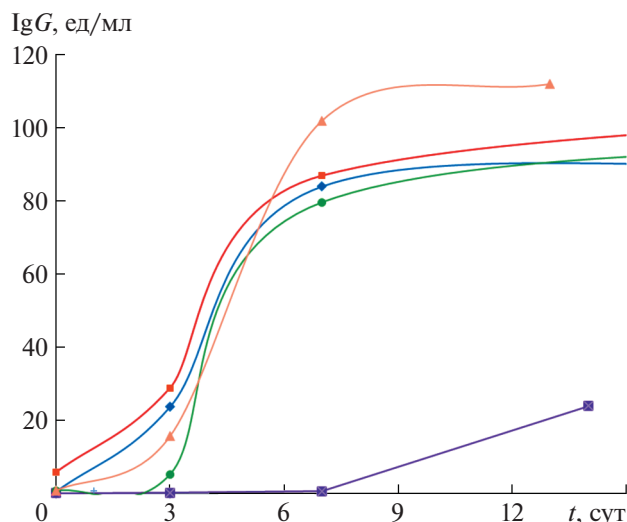


Рис. 2. Динамика накопления IgG к шиповому S-белку поверхности коронавируса SARS-CoV-2 в контрольной группе при стандартном лечении (приведены типичные кривые).

мулирует синтез антител, как типа иммуноглобулина G, так и типа иммуноглобулина M. В клинику поступает часть больных с уже сформировавшимся высоким уровнем IgG и IgM. Как в “рабочей”, так и в контрольной группе таких больных около 25%. Для кинетического анализа оказались пригодны данные с полным набором измерения уровня антител (4 измерения: при поступлении, на 3-и, 7-е сутки и при выписке). На рис. 2 и 3 приведены экспериментальные данные по динамике накопления IgG в контрольной (рис. 2) и “рабочей” группе (рис. 3). Видно принципиальное различие в кинетике иммунного ответа.

При лечении пациентов контрольной группы без использования ингаляций термогелиоксом в течение первых трех суток синтез антител IgG практически блокирован (период индукции на кинетической кривой накопления IgG). Использование термогелиокса (4 ингаляционных процедур по 15 мин с 15-минутным перерывом) пациентам “рабочей” группы элиминирует период индукции и включает синтез иммуноглобулина G с первого момента применения процедуры. Следует отметить, что приблизительно 30% пациентов поступают в клинику с уже завершенным этапом активации иммунного ответа (на кинетических кривых накопления IgG не наблюдается период индукции).

Термогелиокс также стимулирует образование IgM. Различия в кинетике накопления IgM в “рабочей” и контрольной группе не столь значительны, как в случае IgG. Термогелиокс заметно стимулирует накопление IgM на начальном этапе развития процесса. Например, среднее значение

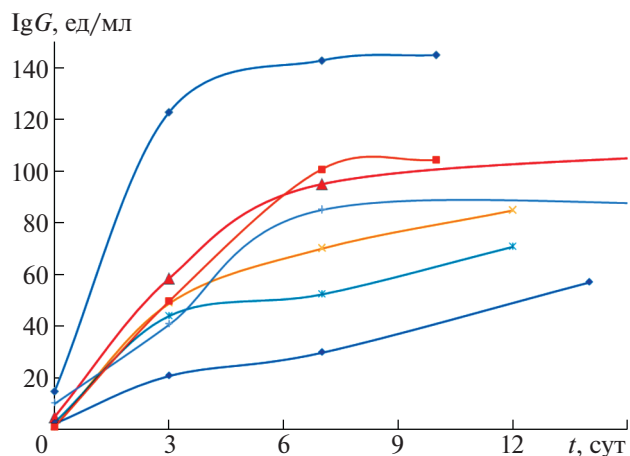


Рис. 3. Динамика накопления IgG к шиповому S-белку поверхности коронавируса SARS-CoV-2 в “рабочей” группе при лечении термогелиоксом (приведены типичные кривые).

$IgM(3)/IgM(0)$ для всей совокупности данных для пациентов, прошедших ингаляцию термогелиоксом, равно 4.1, а для контрольной группы — 3.2.

Полученные результаты по динамике синтеза иммуноглобулинов IgG и IgM однозначно демонстрируют, что применение термогелиокса при лечении поражения коронавирусной инфекцией приводит к активации иммунной системы и стимулирует образование специфических антител.

Иммунный ответ организма имеет сложный характер, при этом включаются различные биохимические системы организма [12, 13]. В частности, С-реактивный белок (СРБ) рассматривается как один из компонентов сложной цепи биохимических процессов, одним из первых реагирующих на бактериальную и вирусную инфекцию. Синтез СРБ индуцируется цитокинами и разрушением легочных тканей [14, 15]. Нами исследована сравнительная динамика накопления и уменьшения СРБ в процессе стандартного лечения и лечения с участием ингаляций термогелиоксом. Обнаружено принципиальное отличие в динамике ответа (рис. 4).

Видно, что при “нормальном” течении болезни в контрольной группе в большинстве случаев происходит относительно медленное накопление СРБ, достигающее максимального значения на 2–4-е сутки лечения (рис. 4, кривые выше пунктирной линии). Последующий процесс лечения в динамике характеризуется уменьшением СРБ до нуля. Ингаляция термогелиоксом в “рабочей” группе стимулирует быстрое накопление СРБ с переходом системы с самого начального периода к экспоненциальному уменьшению уровня СРБ (рис. 4, кривые ниже пунктирной линии). Среднестатистически применение термогелиокса

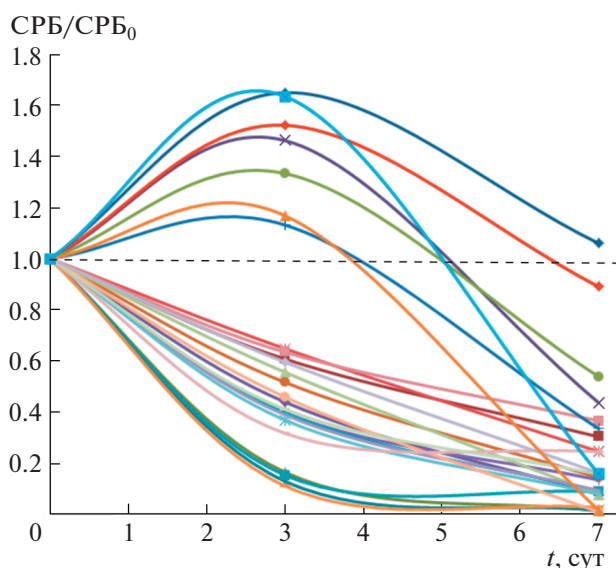


Рис. 4. Динамика изменения содержания СРБ в крови пациентов контрольной (кривые с максимумом) и “рабочей” (экспоненциальное падение) групп (результаты эксперимента нормированы на показатель СРБ₀ при поступлении пациента ($t = 0$)).

уменьшает время пребывания пациента в больнице на 2–2.5 дня.

Стимулирование иммунного ответа термогелиоксом можно определить термином “термовакцинация”. Нами экспериментально показано, что на 2–3-и сутки использования термогелиокса в большинстве случаев организм освобождается от вирусных частиц по результатам ПЦР анализа. Мы предполагаем, что ускоренная выработка антител происходит, по-видимому, на белки-продукты термодеструкции вирусных частиц в легких пациентов. Таким образом, в обсуждаемом нами случае имеет место “классическая” вакцинация ослабленным или разрушенным антигеном. Принципиально положительное отличие заключается в том, что процесс идет *in vivo* с участием естественных вирусных белков, и “термовакцинация” может иметь широкий спектр специфичности.

Механизм наблюдаемого нами эффекта стимуляции иммунного ответа термогелиоксом требует дальнейшего исследования. Развита и исследованная нами кинетическая модель [3–5] объясняет наблюдаемые эффекты увеличением концентрации антигена при термодеструкции вируса.

Впервые обнаруженные и описанные нами эффекты “термовакцинации” при лечении коронавирусного поражения – стимуляция иммунного ответа термогелиоксом – могут иметь общий характер и быть применены при лечении поражения вирусами другой природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // Nature. 2020. V. 579. № 7798. P. 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
2. Martinez M.A. Clinical trials of repurposed antivirals for SARS-CoV-2 // Antimicrob. Agents Chemother. 2020. V. 64, № 9. e01101-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01101-20>
3. Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Быков В.И., и др. Кинетическая модель развития острой вирусной инфекции в организме человека. Критические условия, механизмы управления, термогелиокс // Известия РАН, Серия химическая. 2020. Т. 69. № 6. С. 1179–1184. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2886-4>
4. Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Быков В.И., и др. Термовакцинация, термогелиокс как стимулятор иммунного ответа. Кинетическая модель развития процесса. // Известия РАН, Серия химическая. 2020. Т. 69. № 9. С. 1811–1815. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2966-5>
5. Varfolomeev S.D., Panin A.A., Bykov V.I., et al. Chemical kinetics of the development of coronavirus infection in the human body: Critical conditions, toxicity mechanisms, “thermoheliox”, and “thermovaccination” // Chemico-Biological Interactions. 2020. V. 329. P. 109209. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109209>
6. Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Рябоконе А.М., и др. Протеом конденсата выдыхаемого воздуха при воздействии высокотемпературного термогелиокса // Известия РАН, Серия химическая. 2020. Т. 69. № 9. С. 1816–1818. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2967-4>
7. Варфоломеев С.Д., Панин А.А., Рябоконе А.М., и др. Протеом термического гелиокса. Высокотемпературный гелиокс не вызывает разрушение клеток дыхательной системы человека // Терапевтический архив. 2020. Т. 92. № 6. С. 69–72.
8. Zhu H., Zhang H., Xu Y., et al. PCR past, present and future // BioTechniques. 2020, <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
9. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., et al. Real time quantitative PCR // Genome Res. 1996. Vol. 6, № 10. P. 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
10. Wilson D.D. McGraw-Hill Manual of Laboratory and Diagnostic Tests. New-York: McGraw-Hill Medical; 2007.
11. Li Y., Xia L. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Role of chest CT in diagnosis and management // AJR. Am. J. Roentgenol. 2020. V. 214. № 6. P. 1280–1286. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.22954>
12. Long Q., Liu B., Deng H. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 // Nat. Med. 2020. V. 26. P. 845–848. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
13. Catanzaro M., Fagiani F., Racchi M., et al. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2 // Signal Transduct. Target. Ther. 2020. V. 5.

- P. 84.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0191-1>
14. *McGonagle D., Sharif K., O'Regan A., et al.* The role of cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease // *Autoimmun. Rev.* 2020. V. 19. № 6. P. 102537.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>
15. *Potempa L.A., Rajab I.M., Hart P.C., et al.* Insights into the use of C-reactive protein as a diagnostic index of disease severity in COVID-19 infections // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020. V. 103. № 2. P. 561–563.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0473>

THERMOVACCINATION – THERMOHELIOX AS AN IMMUNE RESPONSE STIMULATOR. KINETICS OF ANTIBODIES AND C-REACTIVE PROTEIN SYNTHESIS IN CORONAVIRAL INFECTION

Corresponding Member of the RAS **S. D. Varfolomeev^{a,e}, S. V. Zhuravel^b, A. A. Panin^c, L. V. Shogenova^d, V. I. Bykov^e, S. B. Tsybenova^{e,#}, A. M. Ryabokon^{e,f}, I. I. Utkina^b, P. V. Gavrilov^b, and A. G. Chuchalin^d**

^a *Institute of Physicochemical Foundations of the Functioning of Neural Network and Artificial Intelligence, Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation*

^b *N.V. Sklifosovsky Federal Research Institute of Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation*

^c *OOO “MedTechInnovations”, Moscow, Russian Federation*

^d *N.I. Pirogov Russian State National Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

^e *Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^f *Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

The high efficiency of using thermogeliox (inhalation with a high-temperature mixture of helium and oxygen) in the treatment of patients affected by COVID-19 is shown. The dynamics of accumulation of IgG, IgM and C-reactive protein (CRP) in patients with coronavirus infection in the “working” and control groups was experimentally studied. It is shown that thermogeliox intensifies the synthesis of IgG, IgM antibodies and CRP, while eliminating the induction period on the kinetic curves of the synthesis of specific antibodies in IgG form and transfers the synthesis of CRP to a fast phase. The experiment results confirm the previously obtained data based on the analysis of the kinetic model of the development of coronavirus infection in the human body.

Keywords: coronavirus, kinetic model, thermogeliox, immunoglobulin G, immunoglobulin M, C-reactive protein, thermovaccination

УДК 636.2: 591.39: 576.5

ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНИРОВАННОГО ПОТОМСТВА И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2021 г. Г. Н. Сингина^{1,*}, П. В. Сергиев^{2,3,4}, А. В. Лопухов¹, М. П. Рубцова⁴, Н. П. Тарадайник¹, Н. В. Равин⁵, Е. Н. Шедова¹, Т. Е. Тарадайник¹, И. А. Полежаева⁶, А. В. Доцев¹, иностранный член РАН Г. Брем⁷, академик РАН О. А. Донцова^{3,4,8,9}, академик РАН Н. А. Зиновьева¹

Поступило 10.10.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принято к публикации 21.10.2020 г.

Методом клонирования ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) впервые в России получено жизнеспособное потомство крупного рогатого скота. Полногеномное SNP-генотипирование подтвердило полную идентичность генотипа клонированного теленка и линии фибробластов, используемых для SCNT. С использованием системы CRISPR/Cas9 выполнен нокаут генов бета-лактоглобулина (*PAEP*) и бета-лактоглобулин подобного белка (*LOC100848610*) в вышеназванной клеточной линии. Эффективность геномного редактирования (gene editing, GE) обоих генов составила 4.4%. Получены клоны индивидуальных фибробластов с нокаутом генов *PAEP* и *LOC100848610*, которые будут использованы для получения GE-потомства крупного рогатого скота с дефицитом бета-лактоглобулина.

Ключевые слова: *Bos taurus*, соматическое клонирование, редактирование генома, нокаут бета-лактоглобулина

DOI: 10.31857/S2686738921010212

Технология геномного редактирования (gene editing, GE) в сочетании с методом клонирования ядер соматических клеток (somatic cell nuclear

transfer, SCNT) имеет широкие перспективы применения для решения задач, направленных на создание новых генотипов, в том числе с измененными хозяйственно-полезными признаками [1, 2]. В частности, получение клонированных эмбрионов с использованием эмбриональных фибробластов, в геноме которых инактивирован ген β -лактоглобулина (*BGL*), и их трансплантация животным-реципиентам ожидаемо позволит получить коров, способных производить молоко с пониженными аллергенными свойствами [3]. Использование системы на основе CRISPR/Cas9 в качестве инструмента редактирования генома соматических клеток следует рассматривать как наиболее эффективный и инновационный подход, находящий все большее применение у домашних животных [4, 5]. Метод SCNT позволяет проводить отбор мутантных клеток перед началом дорогостоящих экспериментов на животных и гарантировать получение потомства с запланированными модификациями генов. Привлекательность системы на основе CRISPR/Cas9 определяется ее высокой эффективностью, простотой и малой трудоемкостью [6].

Целью исследований являлось конструирование SCNT-эмбрионов крупного рогатого скота с использованием эмбриональных фибробластов в качестве доноров ядер, оценка их развития до

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”, Московская обл., Подольск, Россия

² Институт функциональной геномики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологии, Сколково, Россия

⁴ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Институт биоинженерии, ФИЦ биотехнологии РАН, Москва, Россия

⁶ Отдел животноводства и ветеринарных наук, Государственный университет штата Юта, Логан, Юта, США

⁷ Департамент животноводства и генетики, Ветеринарно-медицинский университет, Вена, Австрия

⁸ НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁹ Институт биоорганической химии Российской академии наук имени академика М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

*e-mail: g_singina@mail.ru

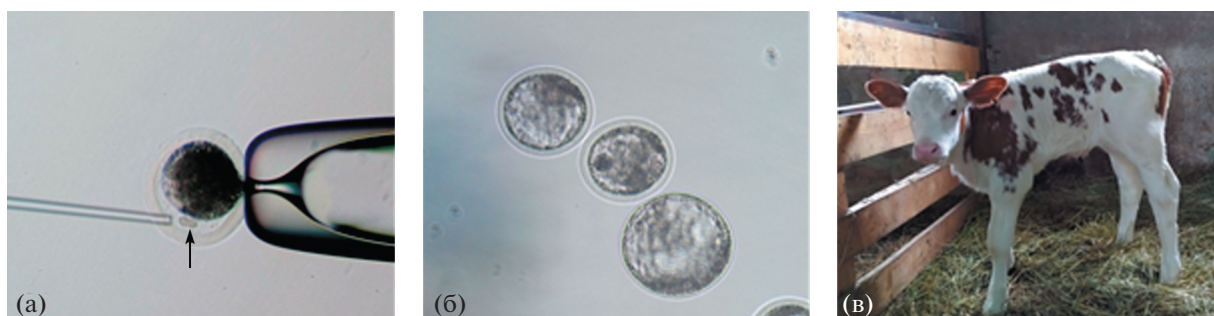


Рис. 1. Фотографии (а) процедуры переноса соматической клетки (показано стрелкой) в перивителлиновое пространство энуклеированного ооцита, (б) клонированных эмбрионов крупного рогатого скота, использованных для трансплантации животным-реципиентам, а также (в) клонированного теленка (полученного в России впервые).

жизнеспособного потомства, а также в получение культуры индивидуальных фибробластов с нокаутом гена β -лактоглобулина.

Для SCNT выделенные *post mortem* ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК, $n = 1332$) созревали в среде ТС-199, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, 10 мкг/мл фолликулостимулирующего и 10 мкг/мл лютеинизирующего гормонов. Через 20–24 ч созревания ОКК обрабатывали 0.1% раствором гиалуронидазы, механически удаляли кумулюсные клетки и отбирали ооциты с первым полярным тельцем (ППТ, $n = 1088$). Эмбриональные фибробласты культивировали до сформированного монослоя, контактно ингибировали в течение 2 сут и к процедуре переноса в энуклеированный ооцит (рис. 1а) готовили в виде суспензии. Для объединения ооцитов и перенесенных в их перивителлиновое пространство клеток применяли два последовательных импульса постоянного тока напряжением 35 В продолжительностью 20 мкс (однократно или в случае отсутствия признаков объединения клеток – двукратно). Полученные цитогриды ($n = 422$, 44.5% от числа ооцитов с ППТ) активировали иономицином через 2 ч после слияния и культивировали до стадии бластоцисты (рис. 1б). С целью оценки полноценности и жизнеспособности полученных эмбрионов часть из них ($n = 81$) была пересажена синхронизированным по циклу реципиентам, оставшиеся бластоцисты были использованы для цитологического анализа состояния ядерного материала ($n = 16$, среднее число ядер 78.3). В качестве реципиентов использовали телок случного возраста в спонтанном и синхронизированном цикле. Перед трансплантацией проводили сакральную эпидуральную анестезию 2%-м раствором новокаина. Пересадку эмбрионов (1–6 эмбрионов на одно животное) проводили нехирургическим методом глубоко в рог матки.

Было установлено, что после активации 64.5% (272/422) цитогридов формируют 2-х клеточные эмбрионы и 23.0% (97/422) развивается до стадии бластоцисты. Доля стельных животных после трансплантации клонированных бластоцист 31 реципиенту составила 43.8% (14/31), доля рожденного живого потомства – 3.3% (1/31) (рис. 1в).

Для оценки происхождения полученного теленка проводили полногеномное SNP-генотипирование потомства и клеточной линии с использованием ДНК-чипа высокой плотности Bovine GGP HD (Neogen/Illumina Inc., США). Для оценки степени сходства проводили расчет значений дистанций IBS (идентичность по состоянию) с использованием программы PLINK 1.9. Значения IBS дистанций для пары теляток – клеточная линия составили 1.000, что подтверждает идентичность генотипа полученного теленка и клеточной линии (для сравнения, IBS-дистанции между не родственными животными симментальской породы варьируют от 0.731–0.763).

Учитывая, что в геноме крупного рогатого скота ген бета-лактоглобулина (*BLG*) дублирован и представлен двумя близкими паралогами, собственно *BLG (PAEP)* и *BLG* подобным геном (*LOC100848610*), нами была выбрана стратегия, предусматривающая инактивацию обоих генов-паралогов (рис. 2).

При создании генной конструкции на основе CRISPR в качестве основы для инактивации генов *PAEP* и *LOC100848610* был выбран вектор pX458 [7], содержащий гибридный ген Cas9 и зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), кодирующие области которых отделены друг от друга последовательностью, кодирующей Р2А пептид. Плазмида pX458 была разрезана эндонуклеазой рестрикции *BbsI*. С остовом плазмиды были лигированы гибридные олигонуклеотиды, содержащие последовательно-

(a)
 CTGCAGAGCTCAGAAGCGTGACC CCAGCTGCAGCCATGAAGTGCCTCCTGCTTGCCTGGCCCTCACC
 TGTGGCG CCCAGGCCCTCATTGTCACCCAGACCATGAAGGGCCTGGATATCCAGAAGGTCGAGGGT
 GCCCG

(б)
 ATGAAGTGCTTCCTGCTCGCCCTG GGCCTGGCCCTGTGG CATCCAAGGCTGCCTACATCCCCA
 GATGGCAGGAGACCTGGACATTAGAAAGGTGTGGGGTCTGGGGTGGAGGGTGGGCGCCAGGGGCT
 GGGGTCCGGGGCTGAGAGGGGACAGGAAAGCCTGGACTGCAGAAGTCTAACGCGGGACCA

Рис. 2. Схема участков генов (а) *PAEP* (BLG) и (б) *LOC100848610* (BLG подобный белок) в геноме *Bos taurus*, выбранных в качестве мишени для геномного редактирования. Участки гибридизации праймеров для амплификации геномных фрагментов показаны голубой заливкой. Предполагаемые участки разрезания ДНК системой CRISPR/Cas9 показаны фиолетовой заливкой. Участки гибридизации гидовых РНК показаны желтой заливкой.

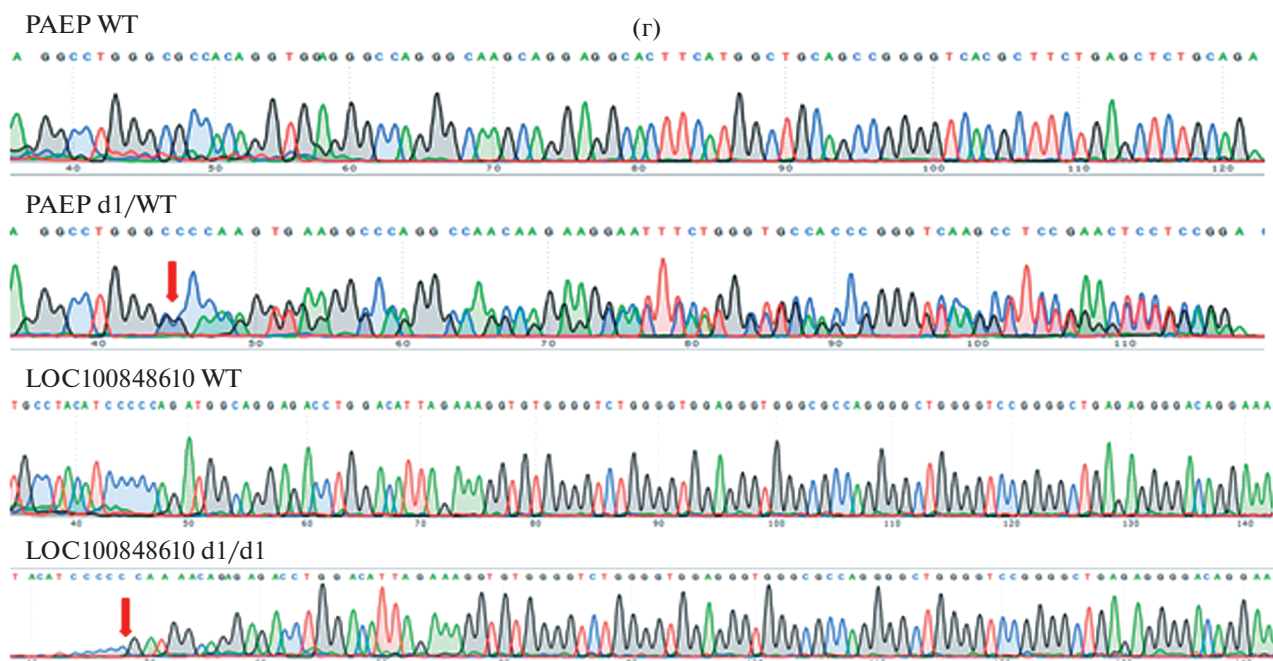
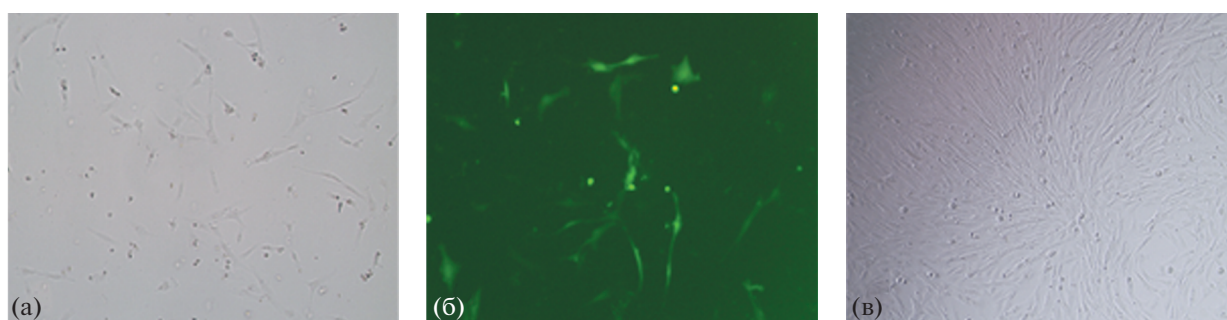


Рис. 3. Микрофотографии (а) общего пула трансфицированных фибробластов *Bos taurus* через 48 ч после электропорации смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленных на инактивацию генов *PAEP* и *LOC100848610* и (б) клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9 и GFP (зеленое свечение). (в) культура индивидуальной колонии, трансфицированных клеток. (г) результаты секвенирования ампликона участка гена *PAEP* и гена *LOC100848610*. Видны микровставки и микроделеции в области разрезания гена системой CRISPR/Cas9. Генотипы подписаны. Места мутаций обозначены стрелками.

сти гидовых РНК. После лигирования и трансформации компетентных клеток *E. coli JM109* выросшие колонии были использованы для наращивания биомассы и выделения плазмид, которые на основании подтверждения успешного клонирования конструкций секвенированием были использованы для трансфекции фибробластов крупного рогатого скота. Трансфецированные соматические клетки, содержащие плазмиду, кодирующую компоненты системы CRISPR/Cas9, были отделены от нетрансфецированных клеток при помощи высокопроизводительного клеточного сортера BD FACSAria III.

Высокопроизводительное секвенирование ампликонов целевых участков генов *PAEP* и *LOC100848610* в предварительно отсортированной популяции эмбриональных фибробластов показало наличие, соответственно, 12 и 7.5% мутантных последовательностей, содержащих делеции и вставки нуклеотидов в местах предполагаемых разрывов.

Для получения индивидуальных колоний GE-фибробластов коровы была проведена электропорация фибробластов ранних пассажей смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленных на инактивацию генов *PAEP* и *LOC100848610* (рис. 3а).

После сортировки (как описано выше, рис. 3б) общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2–3 сут, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти луночные планшеты и культивировали до получения колоний (рис. 3в) и формирования ими 80–90% монослоя. Доля сформированных колоний составила 21.3% от общего числа клеток (90/389). Одна часть каждой колонии была заморожена для возможного дальнейшего использования, а другую часть использовали для выделения ДНК и анализа на наличие мутаций. С этой целью проводили амплификацию фрагментов генов *PAEP* и *LOC100848610*, содержащих целевые области, с последующим секвенированием по Сэнгеру (рис. 3г). В 4 из 90 полученных колоний индивидуальных фибробластов был установлен нокаут генов *PAEP* и *LOC100848610*, что соответствует эффективности геномного редактирования 4.4%.

Таким образом, в результате проведенных исследований подтверждена компетентность линии фетальных фибробластов крупного рогатого скота к развитию до жизнеспособного потомства методом SCNT, впервые с использованием системы CRISPR/Cas9 получена линия эмбриональных фибробластов с нокаутом генов *PAEP* и *LOC100848610*. Полученная клеточная линия будет использована для получения GE-потомства крупного рогатого скота с отсутствием синтеза бета-лактоглобулина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-07089) и Министерства науки и высшего образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Salamone D., Baraňao L., Santos C., et al.* High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow // *Journal of Biotechnology*. 2006. V. 124. № 2. P. 469–472.
2. *Wang J., Yang P., Tang B., et al.* Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows // *Jornal of Dairy Science*. 2008. V. 91. № 12. P. 4466–4476.
3. *Yu S., Luo J., Song Z., et al.* Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // *Cell Research*. 2011. V. 21. P. 1638–1640.
4. *Zhou W., Wan Y., Guo R., et al.* Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9 // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. № 10. e0186056.
5. *Cong L., Ran F.A., Cox D., et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems // *Science*. 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
6. *Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А.* Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве // *Биотехнология*. 2018. Т. 34. № 3. С. 9–22.
7. *Ran F., Hsu P., Wright J. et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. 2013. V. 8. P. 2281–2308.

PRODUCTION OF A CLONED OFFSPRING AND CRISPR/CAS9 GENOME EDITING OF EMBRYONIC FIBROBLASTS IN CATTLE

G. N. Singina^{a, #}, P. V. Sergiev^{b, c, d}, A. V. Lopukhov^a, M. P. Rubtsova^d, N. P. Taradajnic^a, N. V. Ravin^e, E. N. Shedova^a, T. E. Taradajnic^a, I. A. Polejaeva^f, A. V. Dozev^a, G. Brem^g,
academician of the RAS O. A. Dontsova^{c, d, h, i}, and academician of the RAS N. A. Zinovieva^a

^a L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Podolsk, Russian Federation

^b Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Russian Federation

^d *Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

^e *Research Center of Biotechnology, Moscow, Russian Federation*

^f *Department of Animal, Dairy and Veterinary Sciences, Utah State University, Logan, UT, USA*

^g *Department of Animal Breeding and genetics, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria*

^h *A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

ⁱ *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation*

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

Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) technique was used to produce the first viable cloned cattle offspring in Russia. Whole genome SNP genotyping confirmed that the cloned calf was identical to the fibroblast cell line that was used for SCNT. CRISPR/Cas9 approach was subsequently used to knock out genes for beta-lactoglobulin gene (*PAEP*) and the beta-lactoglobulin-like protein gene (*LOC10084810*) in the fibroblast cells. Gene editing (GE) efficiency was 4.4% for these genes. We successfully obtained single-cell-derived fibroblast colonies containing *PAEP* and *LOC10084810* knockouts, which will be used to produce beta-lactoglobulin deficient cattle.

Keywords: *Bos taurus*, somatic cloning, gene editing, beta-lactoglobulin knock-out

УДК 577.34

РЕКОМБИНАНТНАЯ ЛЮЦИФЕРАЗА ГРИБА *Neonothopanus nambi*: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2021 г. А. Ю. Гороховатский¹, Т. В. Чепурных¹, А. С. Щеглов¹, Ю. А. Мокрушина¹,
М. Н. Баранова¹, С. А. Гончарук¹, К. В. Пуртов^{2,*}, В. Н. Петушков²,
Н. С. Родионова², И. В. Ямпольский¹

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном

Поступило 15.10.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принято к публикации 29.10.2020 г.

Ключевым компонентом недавно описанной биолюминесцентной системы высших грибов является люцифераза, относящаяся к новому классу белков. Свойства грибной люциферазы и их взаимосвязь с ее строением интересны как для улучшения уже созданных на ее основе автолюминесцентных систем, так и для создания новых. Поэтому крайне важным является понимание пространственной структуры этого белка. Нами выполнены гетерологическая экспрессия и очистка люциферазы *Neonothopanus nambi*, получен белок, пригодный для последующей кристаллизации, а также определены некоторые биохимические свойства рекомбинантной люциферазы.

Ключевые слова: биолюминесценция, люцифераза, nnLuz, *Neonothopanus nambi*, гетерологическая экспрессия, *Pichia pastoris*

DOI: 10.31857/S2686738921010091

Биолюминесцентные системы широко применяются как в исследовательских целях, так и для разработки лекарств и диагностики [1–6]. Недавно расшифрованная биолюминесцентная система грибов является перспективным инструментом для биомедицинских исследований [7]. На ее основе уже созданы автономно люминесцирующие дрожжи [8] и растения [9]. Однако ключевой компонент этой системы – люцифераза (nnLuz) – остается малоизученной. Отсутствие гомологии с другими ферментами не позволяет смоделировать пространственную структуру этого белка, а сложность выделения из природного источника препятствует получению достаточного количества белка для кристаллизации и характеризации его свойств. Таким образом, получение рекомбинантной люциферазы *N. nambi* сегодня является актуальной задачей.

На первом этапе работы мы сравнили активность люциферазы *N. nambi* при экспрессии в трех стандартных системах: кишечной палочке *E. coli*, дрожжах *Pichia pastoris* и линии клеток человека HEK293T. Максимальную люминесценцию в ответ на добавление люциферина грибов продемонстрировали дрожжи *P. pastoris*. Поэтому для дальнейших экспериментов было решено использовать штамм дрожжей, продуцирующий люциферазу с последовательностью из 6 остатков гистидина на С-конце белка. Культивацию дрожжей проводили по стандартной методике, используя штамм GS115 [10].

Биомассу дрожжей лизировали в 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 100 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и 1 мМ PMSF, при помощи гомогенизатора высокого давления (600 бар, IKA HPH). Лизат центрифугировали (8000 g × 30 мин) при 4°C, мембранную фракцию, содержащую люциферазу, осаждали ультрацентрифугированием (150000 g × 90 мин) при 4°C. Для подбора условий солиubilизации люциферазы мембраны суспензировали в 50 мМ NEPES-Na буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 20% глицерин (буфер А) и различные детергенты, при 4°C в течение ночи (рис. 1). Почти все рассмотренные детергенты показали приблизительно одинаковую способность экстрагировать люциферазу, кроме детергента OG (октил-

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт биофизики Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”, Красноярск, Россия

*e-mail: purtovk@mail.ru

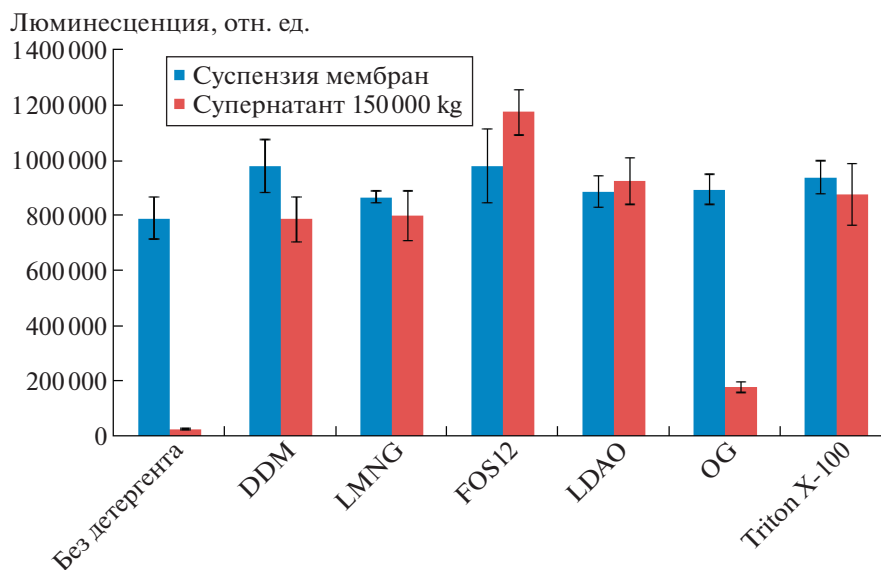


Рис. 1. Солюбилизация люциферазы ppLuz из мембран *P. pastoris*, суспендированных в буфере (см. текст) с добавками различных детергентов в концентрации 10 мМ (100 мМ для OG) в течение 16 ч при 4°C. После центрифугирования (150 000 g × 90 мин) при 4°C биолюминесцентную активность люциферазы в супернатанте измеряли в 200 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ Na₂SO₄, 0.1% DDM и 50 мкМ люциферина грибов. Представлены средние значения ± стандартное отклонение.

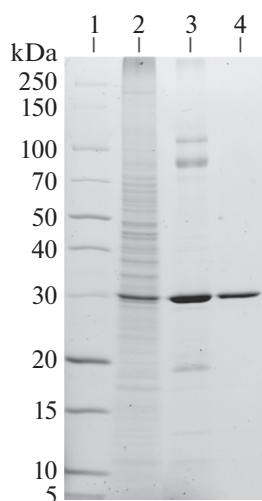


Рис. 2. Электрофорез в денатурирующих условиях фракций в ходе выделения рекомбинантной люциферазы *N. nambi*. 1 – маркеры молекулярной массы; 2 – мембранная фракция клеток *P. pastoris*; 3 – фракция, содержащая рекомбинантную люциферазу *N. nambi*, после металл-хелатной хроматографии; 4 – фракция, содержащая рекомбинантную люциферазу *N. nambi*, после гель-фильтрационной хроматографии. Гель окрашен Кумасси G250.

гликозида). Для препаративной экстракции был использован именно DDM в концентрации 10 мМ, ввиду его доступности и хорошей применимости для хроматографии с УФ-детекцией. Все хроматографии проводили на холоду. Детергент-солюбилизованную фракцию мембран наносили на колонку с сорбентом TALON для металл-аффинной хроматографии, уравновешенную бу-

фером А с 0.02% DDM, и промывали колонку этим же буфером. Далее колонку промывали 20 мМ MES-Na, 0.5 М NaCl, 10% глицерин буфером, pH 6.2 (буфер В), содержащим 0.02% DDM. Сорбированную люциферазу элюировали буфером В, содержащим 0.1% DDM и 200 мМ имидазол. Фракции с наибольшей люминесцентной активностью наносили на колонку с Sephacryl S-300

Таблица 1. Анализ полученного спектра кругового дихроизма

Число а.о.	Альфа-спираль, %	Бета-структура, %	Поворот, %	Неупоряд., %	NRMSD
275	21.5	26.8	22.5	29.1	0.05

в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.0, содержащем 150 мМ NaCl и 0.04% DDM, для гель-фильтрации. В результате была получена рекомбинантная люцифераза *N. nambi* с чистотой более 95% (рис. 2) и с выходом 10 мг с литра культуры *P. pastoris*.

При гель-фильтрации на колонке Superdex200 в присутствии мицелл детергента DDM люцифераза элюируется одним пиком, соответствующим молекулярной массе около 60 кДа. С одной стороны, люцифераза может представлять собой димер, так как расчетная масса мономера, определенная по аминокислотной последовательности, 31.4 кДа. Однако с учетом размеров мицеллы DDM (40–70 кДа) и условий гель-фильтрации, люцифераза более вероятно является мономером, связанным с детергентом, хотя точная стехиометрия такого комплекса остается неизвестной.

Полученный после гель-фильтрации препарат люциферазы был исследован методом спектроскопии кругового дихроизма. Спектр получен в 20 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 100 мМ NaCl, 0.04% DDM, pH 7.4, 5°C на спектрополяриметре J-810 (JASCO, Япония) при концентрации белка 11 мкМ в кювете толщиной 0.01 см. Для обсчета данных использованы программа CONTINLL (пакет CDPPro), набор референсных спектров: SMP56. Результат анализа полученного спектра представлен в табл. 1. Наличие представленных в таблице бета-структур и альфа-спиральных участков говорит о высокой вероятности наличия белка с нативной структурой в очищенном препарате люциферазы.

Активность люциферазы *in vitro* радикально зависит от наличия детергентов в среде (рис. 3). Мы провели сравнение биоломинесцентной активности рекомбинантной nnLuz в присутствии Tween-20, Triton X-100, NP-40, дигитонина,

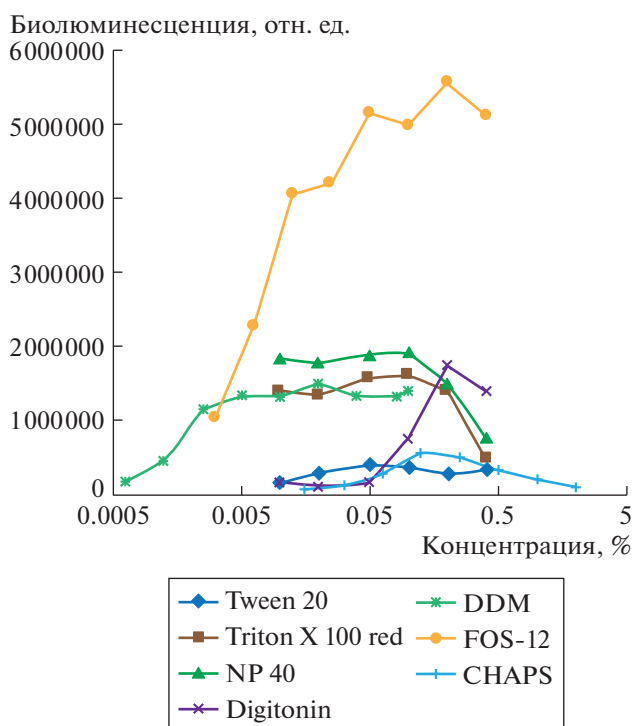


Рис. 3. Влияние детергентов на биоломинесценцию люциферазы. Реакцию проводили в 200 мМ Na-фосфатном буфере pH 8.0, содержащем указанную концентрацию детергента и 50 мкМ люциферина грибов. Измерения проводили в течение 30 сек. Представлены интегрированные значения интенсивности света.

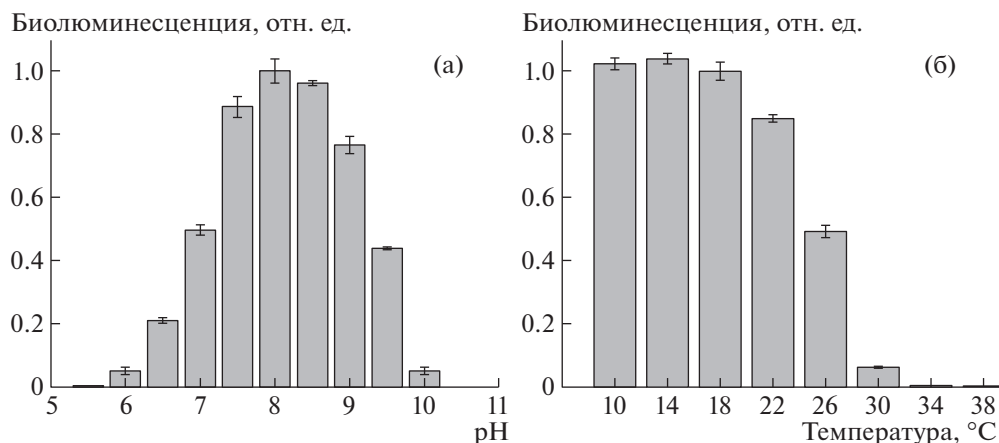


Рис. 4. pH-зависимость (а) и термостабильность (б) биолуминесценции люциферазы *N. nambi*. Измерение люминесценции проводили после инкубации в течение 10 мин при указанной температуре в 100 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.0. Реакцию проводили в 100 мМ буфере указанного pH, содержащем 0.1% DDM и 50 мкМ люциферина грибов при комнатной температуре. Свет интегрировали в течение 60 с. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение.

DDM, FOS-12 и CHAPS. Различные детергенты в разной степени способствуют люминесцентной реакции. Наибольшая активность люциферазы наблюдалась в присутствии FOS-12 (n-Dodecylphosphocholine). Однако нами было показано, что при хранении в присутствии детергента FOS-12 очищенная nnLuz теряет активность, при хранении в присутствии DDM потери активности люциферазы не наблюдалось. Поэтому очистку и измерение ее активности производили также в DDM, чтобы избежать образования смешанных мицелл при измерении.

Оптимальный pH для биолуминесцентной реакции составляет 8.0 (рис. 4а). Рекombинантная люцифераза является термочувствительным ферментом, инкубация в течение 10 мин при температуре 30°C практически полностью инактивирует фермент (рис. 4б).

Была определена константа Михаэлиса-Ментен для реакции окисления люциферина, катализируемой рекомбинантной люциферазой *N. nambi*. Реакцию проводили при концентрации люциферазы 50 нМ в 200 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 500 мМ Na₂SO₄, 0.1% DDM при комнатной температуре, концентрацию люциферина грибов варьировали от 2 нМ до 50 мкМ. Значения начальной интенсивности биолуминесценции аппроксимировали функцией Михаэлиса-Ментен при помощи программного пакета Origin. Km составила 1.09 ± 0.06 мкМ.

Таким образом, в результате проделанной работы получена и охарактеризована рекомбинантная люцифераза *N. nambi*. Разработанная методика выделения этого фермента будет далее использована для наработки достаточных количеств белка для

кристаллизации и исследования пространственной структуры люциферазы методом ЯМР.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ № 16-14-00052-П. Создание штамма дрожжей, продуцирующего люциферазу nnLuz, поддержано грантом Президента для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2605.2020.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan Y., Shi P., Song W., Bi S. Chemiluminescence and Bioluminescence Imaging for Biosensing and Therapy: *in vitro* and *in vivo* Perspectives. // *Theranostics*. 2019. V. 9. P. 4047–4065. <https://doi.org/10.7150/thno.33228>
2. Fleiss A., Sarkisyan K.S. A brief review of bioluminescent systems. // *Current Genetics*. 2019. V. 65. P. 877–882. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00951-5>
3. Pomper M.G., Gelovani J.G. Molecular Imaging in Oncology. // CRC Press. 2008. 744 p. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2004.0060>
4. Shimomura O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. // World Scientific Publishing, Singapore. 2006. 470 p. <https://doi.org/10.1142/6102>
5. van Leeuwen F.W., Hardwick J.C., van Erkel A.R. Luminescence-based Imaging Approaches in the Field of Interventional Molecular Imaging. // *Radiology*. 2015. V. 276 (1). P. 12–29. <https://doi.org/10.1148/radiol.2015132698>
6. England C.G., Ehlerding E.B., Cai W. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. // *Bioconjugate Chemistry*. 2016. V. 27

- (5). P. 1175–1187.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>
7. Ямпольский И.В., Осипова З.М., Щеглов А.С. Новая биолюминесцентная система грибов: перспективы использования в медицинских исследованиях. // Вестник РГМУ. 2018. V. 1. P. 80–83.
<https://doi.org/10.24075/vrgmu.2018.004>
8. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., et al. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America U S A. 2018. V. 115. P.12728–12732.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115>
9. Mitiouchkina T., Mishin A.S., Somermeyer L.G., et al. Plants with genetically encoded autoluminescence. // Nature Biotechnology. 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0500-9>
10. Pichia expression kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and PICZ-alpha in Pichia pastoris. // Invitrogen ES. Catalog. 2009.

THE RECOMBINANT LUCIFERASE OF THE FUNGUS *Neonothopanus nambi*: OBTAINING AND PROPERTIES

A. Yu. Gorokhovatsky^a, T. V. Chepurnykh^a, A. S. Shcheglov^a, Yu. A. Mokrushina^a, M. N. Baranova^a, S. A. Goncharuk^a, K. V. Purtoy^{b,#}, V. N. Petushkov^b, N. S. Rodionova^b, and I. V. Yampolsky^a

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB Russian Academy of Sciences”, Krasnoyarsk, Russian Federation

[#] e-mail: purtovk@mail.ru

Presented by the academician of the RAS I.I. Gitelzon

A key component of the recently described bioluminescent system of higher fungi is luciferase, a new class of proteins. The properties of fungal luciferase and their relationship with its structure are interesting both for improving the autoluminescent systems already created on its basis, and for creating new ones. Therefore, it is extremely important to understand the spatial structure of this protein. We have performed heterologous expression and purification of *Neonothopanus nambi* luciferase, obtained a protein suitable for subsequent crystallization, and determined some biochemical properties of recombinant luciferase.

Keywords: bioluminescence, luciferase, nnLuz, *Neonothopanus nambi*, heterologous expression, *Pichia pastoris*