

СОДЕРЖАНИЕ

Том 499, 2021

От информосом к миру мРНК

А. С. Воронина, Е. С. Пиенникова 287

Новые данные о распространении малого пещерного медведя (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) на Урале

Д. О. Гимранов, М. В. Павлова, О. Г. Нанова, П. А. Косинцев, Н. Г. Смирнов 291

Ультраниантные ритмы температуры тела связаны с особенностями поведения у зеленушки (*Chloris chloris*, Fringillidae, Aves)

М. Е. Диатроптов, А. С. Онаев, А. В. Суров 296

Способ модификации поверхности альгинатных микроносителей для улучшения их биологических свойств

Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, А. Е. Ефимов, О. И. Аганова, И. И. Аганов, С. В. Готье 301

Дюктайский гусь (*Anser djuktaiensis*) и черный журавль (*Grus monacha*) в плейстоцене центральной Якутии

Н. В. Зеленков, Г. Г. Боескорев 304

Первая находка яиц нематоды *Baylisascaris transfuga* Rudolphi, 1819 (Ascaridoidea, Nematoda) в позднем плейстоцене

Т. Н. Сивкова, П. А. Косинцев 309

Ароморфозы в эволюции одноклеточных эукариот (на примере фораминифер – Foraminifera d'Orbigny, 1826)

В. И. Михалевич 312

Регенерация *in vitro* и генетическая близость растений *Hyssopus officinalis* L.

И. В. Булавин, Н. Н. Иванова, И. В. Митрофанова 317

Селекция лабораторных мышей на успешность когнитивного теста и на неспособность к его решению

О. В. Перепелкина, И. И. Полетаева 322

Оценка взаимосвязи уровня белков клеточной подвижности с процессами протеолиза и лимфогенного метастазирования при раке молочной железы

Е. Е. Середва, Е. С. Колегова, Г. В. Какурина, Е. А. Сиденко, Д. А. Коршунов, И. В. Кондакова 327

Определение относительной биологической эффективности тонкого сканирующего пучка протонов на мышах *in vivo*

В. Е. Балакин, О. М. Розанова, Е. Н. Смирнова, Т. А. Белякова, А. Е. Шемяков, Н. С. Стрельникова 332

Многоразовая система обнаружения фенола в водной среде на основе наноалмазов и экстраклеточной оксидазы из базидиомицета <i>Neonothopanus nambi</i>	338
<i>Н. О. Ронжин, О. А. Могильная, Е. Д. Посохина, В. С. Бондарь</i>	
Мутации сайтов фосфорилирования в белке ms11 не влияют на дозовую компенсацию у <i>Drosophila melanogaster</i>	344
<i>В. А. Бабоша, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко</i>	
Экзогенный мелатонин снижает токсическое действие полиметаллического стресса на растения ячменя	348
<i>Е. Д. Данилова, И. Е. Злобин, В. В. Кузнецов, М. В. Ефимова</i>	
Универсальный стрессовый белок GRUSP вовлечен в гиббереллин-зависимую индукцию цветения растений <i>Arabidopsis thaliana</i>	354
<i>Д. С. Горшкова, И. А. Гетман, Л. И. Сергеева, Вл. В. Кузнецов, Е. С. Пожидаева</i>	
О действии сорбционно-стимулирующих препаратов на прорастание семян	360
<i>С. А. Шоба, Г. Н. Федотов, И. В. Горепекин, Д. И. Потапов, Т. А. Грачева</i>	
Влияние гипохлорит- и пероксид-индуцированного окисления фибриногена на структуру фибрина	364
<i>Л. В. Юрина, А. Д. Васильева, Л. А. Вассерман, Н. А. Подоплелова, М. А. Пантелеев, М. А. Розенфельд</i>	
Изменения временной области вариабельности сердечного ритма и кортикостерона после хирургической травматизации перегородки носа у крыс	370
<i>И. В. Кастыро, В. И. Попадюк, И. В. Решетов, М. Г. Костяева, С. Г. Драгунова, Т. Ф. Косырева, Г. В. Хамидулин, П. Е. Шмаевский</i>	
Химическая индукция гипоксии трофобласта хлоридом кобальта приводит к повышению экспрессии <i>DDIT3</i>	375
<i>Е. Н. Князев, С. Ю. Пауль, А. Г. Тоневцкий</i>	
Исследование способности к гомодимеризации N-концевых доменов белков с кластерами цинковых пальцев человека	381
<i>Д. В. Фурсенко, П. Г. Георгиев, А. Н. Бончук</i>	
Влияние энтомопатогенного гриба <i>Beauveria bassiana</i> на развитие заболеваний кормовых бобов (<i>Vicia faba</i>) в полевых условиях	385
<i>Л. Ф. Ашмарина, Г. Р. Леднёв, О. Г. Томилова, Т. А. Садохина, Д. Ю. Бакишев, М. В. Левченко, Н. С. Волкова, М. В. Тюрин, В. П. Данилов, В. В. Глухов</i>	

CONTENTS

Vol. 499, 2021

From Informosomes to the World of mRNP <i>A. S. Voronina and E. S. Pshennikova</i>	287
New Data on the Distribution of the Small Cave Bear (<i>Ursus ex gr. savini-rossicus</i>) in the Urals <i>D. O. Gimranov, M. V. Pavlova, O. G. Nanova, P. A. Kosintsev, and N. G. Smirnov</i>	291
Ultradian Rhythms of Body Temperature Are Related to Temperament in Greenfinch (<i>Chloris chloris</i> , Fringillidae, Aves) <i>M. E. Diatropov, A.S. Opaev, and A. V. Surov</i>	296
Surface Modification of Alginate Microcarriers for Improvement of Their Biological Properties <i>L. A. Safonova, M. M. Bobrova, A. E. Efimov, O. I. Agapova, I. I. Agapov, and S. V. Gautier</i>	301
Dyuktai Goose (<i>Anser djuktaiensis</i>) and Hooded Crane (<i>Grus monacha</i>) in the Pleistocene of Central Yakutia <i>N. V. Zelenkov and G. G. Boeskorov</i>	304
First Finding of Nematode Eggs <i>Baylisascaris transfuga</i> Rudolphi, 1819 (Ascaridoidea, Nematoda) in the Late Pleistocene <i>T. N. Sivkova and P. A. Kosintsev</i>	309
Aromorphoses in Evolution of Unicellular Eukaryotes (with the Example of Foraminifera d'orbigny, 1826) <i>V. I. Mikhalevich</i>	312
<i>In vitro</i> Regeneration of <i>Hyssopus officinalis</i> L. and Plant Genetic Similarity <i>I. V. Bulavin, N. N. Ivanova, and I. V. Mitrofanova</i>	317
Selection of Laboratory Mice for the Cognitive Task Successful Solution and for the Inability to Solve it <i>O. V. Perepelkina and I. I. Poletaeva</i>	322
Relationship Estimation of Cell Mobility Proteins Level with Processes of Proteolysis and Lymphogenic Metastasis in Breast Cancer <i>E. E. Sereda, E. S. Kolegova, G. V. Kakurina, E. A. Sidenko, D. A. Korshunov, and I. V. Kondakova</i>	327
Assessment of the Relative Biological Efficiency of Pencil Beam Scanning of Protons in Mice <i>in vivo</i> <i>V. E. Balakin, O. M. Rozanova, E. N. Smirnova, T. A. Belyakova, A. E. Shemyakov, and N. I. Strelnikova</i>	332
Reusable System for Phenol Detection in an Aqueous Medium Based on Nanodiamonds and Extracellular Oxidase from Basidiomycete <i>Neonothopanus nambi</i> <i>N. O. Ronzhin, O. A. Mogilnaya, E. D. Posokhina, and V. S. Bondar</i>	338

Mutations of Phosphorylation Sites in MSL1 Protein do not Affect Dosage Compensation in <i>Drosophila melanogaster</i> <i>V. A. Babosha, P. G. Georgiev, and O. G. Maksimenko</i>	344
Exogenic Melatonin Reduces the Toxic Effect of Polymetallic Stress on Barley Plants <i>E. D. Danilova, I. E. Zlobin, V. V. Kuznetsov, and M. V. Efimova</i>	348
GRUSP, an Universal Stress Protein, is Involved in Gibberellin-dependent Induction of Flowering in <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>D. S. Gorshkova, I. A. Getman, L. I. Sergeeva, Vl. V. Kuznetsov, and E. S. Pojidaeva</i>	354
On the Sorption-stimulating Preparations Influence on Seed Germination <i>S. A. Shoba, G. N. Fedotov, I. V. Gorepekin, D. I. Potapov, and T. A. Gracheva</i>	360
Effect of Hypochlorite- and Peroxide-induced Oxidation of Fibrinogen on the Fibrin Structure <i>L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva, L. A. Vasserman, N. A. Podoplelova, M. A. Panteleev, and M. A. Rosenfeld</i>	364
Changes in the Time-domain of Heart Rate Variability and Corticosterone after Surgical Trauma to the Nasal Septum in Rats <i>I. V. Kastyro, V. I. Popadyuk, I. V. Reshetov, M. G. Kostyaeva, S. G. Dragunova, T. F. Kosyreva, G. V. Khamidulin, and P. E. Shmaevsky</i>	370
Chemical Induction of Trophoblast Hypoxia by Cobalt Chloride Leads to Increased Expression of <i>DDIT3</i> <i>E. N. Knyazev, S. Yu. Paul, and A. G. Tonevitsky</i>	375
Study of the N-terminal Domains Homodimerization in Human Proteins with Zinc Finger Clusters <i>D. V. Fursenko, P. G. Georgiev, and A. N. Bonchuk</i>	381
Effect of the Entomopathogenic Fungus <i>Beauveria bassiana</i> on the Development of Faba bean (<i>Vicia faba</i>) Diseases in the Field Conditions <i>L. F. Ashmarina, G. R. Lednev, O. G. Tomilova, T. A. Sadokhina, D. Yu. Bakshaev, M. V. Levchenko, N. S. Volkova, M. V. Tyurin, V. P. Danilov, and V. V. Glupov</i>	385

УДК 577.2

К 90-летию академика Александра Сергеевича Спирина

ОТ ИНФОРМОСОМ К МИРУ мРНК

© 2021 г. А. С. Воронина^{1,*}, Е. С. Пшенникова¹

Представлено академиком РАН В.А. Гвоздевым

Поступило 16.03.2021 г.

После доработки 17.03.2021 г.

Принято к публикации 17.03.2021 г.

Рассмотрены основные этапы и достижения в изучении судьбы мРНК эукариот, начавшиеся полвека назад с открытия А.С. Спириным информсом. Результаты даже самых последних исследований подтверждают гипотезы Спирина о структуре и функции информсом, называемых теперь м-РНК. В библиографии мы приводим лишь некоторые из опубликованных работ по перечисленным направлениям. Полный перечень их слишком велик.

Ключевые слова: мРНК, РНК-связывающие белки, тяжелые информсомы, регуляция трансляции

DOI: 10.31857/S2686738921040259

Одним из главных достижений Александра Сергеевича Спирина является открытие РНК-белковых комплексов – информсом [1–4]. Эти работы в основном были сделаны на базе Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР. А.С. Спирин с сотрудниками исследовали седиментационные и плотностные характеристики РНК из экстрактов зародышей костистой рыбы вьюна (*Misgurnus fossilis*) и морского ежа (*L. Pictus*). Оказалось, что пульс-меченная РНК в таких зародышах имеет широкое седиментационное распределение и выявляется в виде комплексов, имеющих плавучую плотность в растворах CsCl, равную 1.40–1.45 г/см³, в отличие от плотности полирибосом (1.51–1.52 г/см³) или рибосом (1.55–1.56 г/см³). Надо отметить, что в те годы метод равновесного центрифугирования в градиентах плотности солей Cs применяли только для изучения структуры ДНК. Для анализа нуклеопротеидов необходимо было предотвратить диссоциацию белка от РНК в растворе соли из-за большой ионной силы. А.С. Спирин первый предложил использовать для этой цели фиксацию формальдегидом [5]. Разделяя рибонуклеопротеиды (РНК) по плавучей плотности в таких градиентах, можно было оценить относитель-

ное содержание РНК и белка. Выведя эмпирически формулу зависимости % содержания белка в РНК от их плавучей плотности в растворе CsCl, удалось определить, что в рибосомах и полирибосомах соотношение белка и РНК примерно 1 : 1, а в мРНК-содержащих частицах количество белка достигает 75–80% [3]. Эти рибонуклеопротеидные комплексы были названы информсомами [1–4]. Был сделан вывод, что мРНК информсом не участвует в трансляции и запасается для более позднего использования. Присутствие в зародышах информсом объясняло феномен периодичности морфогенетической функции ядер, описанный и изученный выдающимся российским эмбриологом А.А. Нейфахом на зародышах иглокожих, рыб и амфибий [6]. Стало ясно, что во время оогенеза и эмбриогенеза мРНК после синтеза запасается впрок, для обеспечения дальнейшего развития. Такая мРНК была названа маскированной [7, 8]. Было предположено, что белки информсом участвуют в защите мРНК от деградации РНКазами во время транспортировки и хранения, а также в регуляции времени и места синтеза белка на этих матрицах.

Размер информсом варьирует из-за гетерогенности размеров мРНК [1, 4]. Кроме того, они могут агрегировать, что увеличивает их коэффициенты седиментации без изменения плавучей плотности. Такие агрегаты стали называть тяжелыми информсомами [4, 9].

В дальнейших работах сотрудников лаборатории А.С. Спирина была обнаружена специфическая фракция свободных белков, названных

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: voronina_a@mail.ru

РНК-связывающими из-за способности образовывать комплексы с РНК. Эти комплексы не отличались по своим седиментационным свойствам и плавучей плотности от информосом. Они названы информосомо-подобными частицами [7, 10–13].

Открытием информосом заинтересовались как отечественные, так и зарубежные ученые. Появились публикации, описывающие информосомы в клетках разных эукариот, включая животных, растения, насекомых [14–16]. В клетках HeLa, зараженных вирусом осповакцины или в клетках куриных эмбрионов, зараженных вирусом Ньюкасла, обнаружены информосомы, содержащие вирус-специфическую мРНК [17, 18]. В ядрах клеток печени крыс учеными из лаборатории Г.П. Георгиева также обнаружены ново-синтезированные предшественники мРНК в частицах, имеющих плавучую плотность в CsCl 1.40 г/см³, как и информосомы [19]. Они были названы информософерами. В этих же препаратах ядер был найден и свободный РНК-связывающий белок [20]. Позднее Т. Педерсон описал в клетках HeLa гетерогенные ядерные РНП с плавучей плотностью в растворе CsCl около 1.40 г/см³, содержащие ядерную РНК [21]. При выходе мРНК из ядра в цитоплазму спектр белков, связанных с ней, изменялся. Сложные ядерные процессы, определяющие образование мРНП и экспорт их в цитоплазму, обобщены в обзоре [22].

мРНК в составе полирибосом эукариот также связана с большим количеством белков [23–25]. При активации белкового синтеза и связывании мРНК с рибосомами происходит частичная смена белкового состава мРНП.

РНК-связывающая активность эукариотических факторов инициации и элонгации, как и других белков, как-либо ассоциированных с РНК, обнаружена еще в семидесятые годы прошлого века. На основании этого А.С. Спирин выдвинул гипотезу о том, что на разных стадиях своей жизни мРНК сама несет на себе белки, требующиеся для ее биогенеза, транспорта из ядра в цитоплазму, существования во временно неактивной форме и функционирования как матрица в полисомах: *Omnia mea mesum porto* – все свое ношу с собой [26]. Согласно этой модели, одни белки связаны с РНК прочно, другие менее прочно, формируя облако вокруг РНК.

Дальнейшее изучение РНК-связывающих белков привело к обнаружению у них протеинкиназной активности [27, 28], способной менять сродство белков с РНК [29].

В работах лаборатории Л.П. Овчинникова, ученика Спирина, был выделен основной белок информосом из ретикулоцитов кролика [30]. Им оказался белок холодового шока УВ1, функционирующий и в ядре. Этот белок связывается с

РНК по всей ее длине, не зависимо от нуклеотидной последовательности. Показано, что трансляционная активность мРНК зависит от количества связанного с ней белка УВ-1. Этот многофункциональный белок в настоящее время активно изучается [31].

Применение в молекулярной биологии методов генной инженерии, иммуноокрашивания и современной микроскопии открыло новые перспективы в изучении судьбы мРНК. С помощью центрифугирования в градиентах плотности CsCl с последующей молекулярной гибридизацией нами была изучена кинетика демаскирования и последующего повторного маскирования индивидуальных мРНК после оплодотворения яиц лягушек *Xenopus laevis* и *Rana temporaria* [32, 33]. Показано, что во время эмбриогенеза активность каждой индивидуальной мРНК подвергается специфической регуляции.

Позже термин “информосомы” был забыт и заменен на “свободные мРНП”, а для изучения мРНП центрифугирование в градиенте плотности CsCl перестали применять. Кроме того, пренебрежительное отношение к нашей науке дало о себе знать. Когда в клетках обнаруживали некие тельца, их называли по содержащимся в них белкам или их функциям, никак не ассоциируя их с информосомами. Так, были описаны и изучены P-bodies, GW-bodies, storage-частицы, нейронные гранулы, EGP-bodies, стресс-гранулы и другие [обзор 34]. Анализ белкового состава этих телец и гранул показал, что белки эти относятся к белкам, обслуживающим мРНК и регулирующим трансляцию. Наконец, в составе этих частиц найдена была и мРНК, что указывало на то, что они и являются тяжелыми информосомами. Функции, которые осуществляют эти белки, оказались теми же, что предсказывал А.С. Спирин для белков информосом: транспорт из ядра, защита от РНК-аз (стабилизация), регуляция трансляции и регулируемый распад мРНК.

Что же известно о мРНП на сегодняшний день?

По современным представлениям, судьба конкретной мРНК в цитоплазме зависит от нуклеотидных последовательностей (цис-элементов) в ее нетранслируемых областях и связывающихся с ними белков, белковых комплексов и малых РНК (транс-факторов). Изменение спектра этих транс-факторов ведет к изменению статуса мРНК. Она может быть маскирована в виде мРНП или неактивного инициаторного комплекса, может передвигаться по клетке с помощью цитоскелета к месту будущей трансляции, заякориваться при локализации в определенном клеточном компартменте, может транслироваться в полисомах, покидать полисомы и переходить вновь в неактивное состояние, или подвергаться уничтоже-

нию. При этом время и место распада конкретных мРНК строго регулируются. Понятно, что спектр связанных с мРНК белков должен изменяться под воздействием определенных сигналов. Проводниками таких сигналов чаще всего выступают протеинкиназы, фосфорилирующие РНК-связывающие белки. Фосфорилирование изменяет константу связывания белков с РНК, что влияет на спектр белков, ассоциированных в данный момент. Не исключено, что неактивные мРНК скапливаются в местах ожидания сигнала к трансляции или транспортировке в определенный клеточный компартмент. Такое скопление способствует агрегации их в большие комплексы, даже гранулы, обнаруживаемые микроскопически. Строго говоря, все эти гранулы подходят под определение тяжелых информосом как агрегатов легких (индивидуальных) информосом. Современные работы по изучению структуры мРНК показали, что действительно, большие комплексы собираются из более мелких [35].

Что касается РНК-связывающих белков, то их уже описано более тысячи. Комбинаторика и конкуренция за места связывания и определяют многообразие влияний этих белков на судьбу мРНК [35, 36]. Количество работ о структуре и функции мРНК растет как снежной ком. Фундамент этого направления науки заложил полвека назад академик А.С. Спирин.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belitsina N.V., Aitkhozhin M.A., Gavrilova L.P. and Spirin A.S.* The messenger ribonucleic acids of differentiating animal cells. // *Biokhimiya*. 1964. V. 29. P. 363–374.
2. *Spirin A.S., Belitsina N.V. and Aitkhozhin M.A.* Informational RNA in early embryogenesis. // *Zh. Obshch. Biol. (Mosc)*, 1964. V. 25. P. 321–338.
3. *Spirin A.S. and Nemer M.* Messenger RNA in early sea urchin embryos; cytoplasmic particles. // *Science*. 1965. V. 150. P. 214–217.
4. *Spirin A.S.* The Second Sir Hans Krebs Lecture, Informosomes. // *Eur. J. Biochem.* 1969. V. 10. P. 20–35.
5. *Spirin A.S., Belitsina N.V. and Lerman M.I.* Use of formaldehyde fixation for studies of ribonucleoprotein particles by caesium chloride density-gradient centrifugation. // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 14. P. 611–615.
6. *Heйфaх A.A.* Сравнительное радиационное исследование морфогенетической функции ядер в развитии животных. // *Журнал общей биологии*. 1961. Т. 22. С. 42–57.
7. *Spirin A.S.* “Masked” forms of Mrna. // *Cur. Top. Dev. Biol.* 1966. V. 1. P. 1–38.
8. *Spirin A.S.* Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? // *Mol. Rep. Dev.*, 1994. V. 38. P. 107–117.
9. *Voronina A.S.* The size of RNA within the composition of heavy informosomes from loach embryo cytoplasm // *Biochemistry (Moscow)*. 1985. V. 50. P. 1300–1304.
10. *Овчинников Л.П., Воронина А.С., Степанов А.С., Белицина Н.В., Спирип А.С.* Информосомоподобные комплексы, образуемые при добавлении РНК к гомогенатам животных клеток. // *Молекулярная Биология*, 1968. Т. 2. С. 601–609.
11. *Stepanov A.S., Voronina A.S., Ovchinnikov L.P., Spirin A.S.* RNA-binding protein factor of animal cell extracts. // *FEBS Lett.* 1971. V. 18. P. 13–18.
12. *Степанов А.С., Воронина А.С.* Образование стабилизированных информосомоподобных частиц при физиологических температурах. // *Доклады АН СССР*. 1972. Т. 203. С. 1418–1421.
13. *Elizarov S.M., Stepanov A.S., Felgenhauer P.E., Chulitskaya E.V.* Involvement of RNA binding proteins in the formation of informosomes *in vivo*. // *FEBS Lett.* 1978. V. 93. P. 219–224.
14. *Kafatos F.C.* Cytoplasmic particles carrying rapidly labeled RNA in developing insect epidermis // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968. V. 59. P. 1251–1258.
15. *Aitkhozhin M.A., Doschanov Kh.J., Akhanov A.U.* Informosomes as a stored form of mRNA in wheat embryos. // *FEBS Lett.* 1976. V. 66. P. 124–126.
16. *Preobrazhensky A.A. and Spirin A.S.* Informosomes and their protein components: The present state of knowledge. // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1978. V. 21. P. 1–138.
17. *Белицина Н.В., Овчинников Л.П., Спирип А.С., и др.* Информосомы клеток HeLa, зараженных вирусом осповакцины. // *Биохимия*. 1968. Т. 33. С. 727–735.
18. *Zaslavsky V.G., Zaides V.M., Volkova M.Y., et al.* Virus-specific informosome components in the extracts of newcastle disease virus infected cells. // *FEBS Lett.* 1971. V. 14. P. 133–136.
19. *Samarina O.P., Krichevskaya A.A., Georgiev G.P.* Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid. // *Nature*. 1966. V. 205. P. 1319–1322.
20. *Voronina A.S.* RNA-binding protein factor in the nuclear extract of rat liver cells. // *FEBS Lett.* 1973. V. 32. P. 310–312.
21. *Pederson T.* Proteins associated with heterogeneous nuclear RNA in eukaryotic cells. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 83. P. 163–183.
22. *Björk P., Wieslander L.* Integration of mRNP formation and export. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. P. 2875–2897.
23. *Perry R.P., Kelly D.E.* Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: Analysis of

- free particles and components of polyribosomes. // *J. Mol. Biol.* 1968. V. 35. P. 37–59.
24. *Henshaw E.C.* Messenger RNA in rat liver polyribosomes: Evidence that it exists as ribonucleoprotein particles. // *J. Mol. Biol.* 1968. V. 36. P. 401–411.
 25. *Blobel G.* A protein of molecular weight 78.000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973. V. 70. P. 924–928.
 26. *Spirin A.S.* Eukaryotic messenger RNA and informosomes: *Omnia mea tecum porto.* // *FEBS Lett.* 1978. V. 88. P. 115–117.
 27. *Auerbach S., Pederson, T.* Phosphorylation of messenger RNA-bound proteins in HeLa cells. // *Biochem Biophys Res Commun.* 1975. V. 63. P. 149–156.
 28. *Stepanov A.S., Kandror K.V., Elizarov S.M.* Protein kinase activity in RNA-binding proteins of amphibia oocytes // *FEBS Lett.* 1982. V. 141. P. 157–160.
 29. *Степанов А.С., Кандрор К.В.* Влияние самофосфорилирования РНК-связывающих белков на их РНК-связывающую активность. // *Доклады АН СССР.* 1984. Т. 275. С. 1227–1230.
 30. *Minikh V.B., Ovshinnikov L.P.* Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. // *Biochemistry (Moscow),* 1992. V. 74. P. 477–483.
 31. *Mordovkina D., Lyabin D.N., Smolin E.A., et al.* Y-box binding proteins in mRNP assembly, translation, and stability control. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 591.
 32. *Воронина А.С., Потехина Е.С.* Трансляционная регуляция синтеза белков, ответственных за дорсо-вентральную дифференцировку зародышей шпорцевой лягушки. // *Онтогенез.* 1999. Т. 30. С. 83–90.
 33. *Voronina A.S. and Pshennikova E.S.* Activity of specific mRNAs in early development of *Xenopus* and *Rana* embryos. // *J. Biol. Sci.* 2006. V. 6. P. 115–120.
 34. *Воронина А.С., Пшенникова Е.С.* мРНП: от информсомом до стресс-гранул. // *Молекулярная биология.* 2010. Т. 44. С. 1–10.
 35. *Quattrone A., Dassi E.* The architecture of the human RNA-binding protein regulatory network. // *iScience.* 2019. V. 21. P. 706–719.
 36. *Eichler C.E., Hakes A.C., Hull B., Gavis E.R.* Compartmentalized oskar degradation in the germ plasm safeguards germline development. // *eLife.* 2020. V. 9. P. 49988.

To the Academician Alexander Spirin 90th anniversary

FROM INFORMOSOMES TO THE WORLD OF mRNP

A. S. Voronina^{a,#} and E. S. Pshennikova^a

^a *A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS V.A. Gvozdev

The main stages and achievements in the investigation of the fate of mRNA in eukaryotic cells, which began half a century ago with the discovery of informosomes by A.S. Spirin, there are discussed. The results of even the most recent studies confirm Spirin's hypotheses about the structure and function of the informosomes, now called mRNPs. In the bibliography, we present only small part of the published articles in these field. The full list is too large.

Keywords: mRNA, RNA-binding proteins, heavy informosomes, translation regulation

УДК 599.742.2. УДК (569.742.2)+551.793.9 (470.5)

НОВЫЕ ДАННЫЕ О РАСПРОСТРАНЕНИИ МАЛОГО ПЕЩЕРНОГО МЕДВЕДЯ (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) НА УРАЛЕ

© 2021 г. Д. О. Гимранов^{1,*}, М. В. Павлова², О. Г. Нанова³,
П. А. Косинцев¹, член-корреспондент РАН Н. Г. Смирнов¹

Поступило 02.03.2021 г.

После доработки 23.03.2021 г.

Принято к публикации 23.03.2021 г.

Изучен нижний первый коренной зуб (m1) пещерных медведей методами традиционной и геометрической морфометрии из позднеплейстоценовых местонахождений Урала. На основе анализа его размеров и формы впервые установлено, что малый пещерный медведь (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) входил в состав фауны из пещер Сказка, Виашер, Динамитная, Чудесница и Черные кости. Подтверждено его присутствие в фаунах из пещер Медвежья, Махневская ледяная, Аша 1, Игнатъевская, Барсучий Дол. Ареал малого пещерного медведя в позднем плейстоцене занимал Северный, Средний и Южный Урал. Ареалы малого пещерного медведя и большого пещерного медведя (*Ursus kanivetz*) перекрывались на Урале от начала (морская изотопная стадия 5e) до середины (середины морской изотопной стадии 3) позднего плейстоцена.

Ключевые слова: *Ursus savini*, *Ursus rossicus*, *Ursus kanivetz*, малый пещерный медведь, плейстоцен, нижний моляр, Урал, распространение, ареал

DOI: 10.31857/S2686738921040107

В настоящее время на основе морфологических и молекулярных данных выделяют 7 видов пещерных медведей. Это медведь Денингера (*Ursus deningeri* von Reichenau, 1904), денингериоидный медведь (*U. deningeroides* Mottl, 1964), кавказский пещерный медведь (*U. kudarensis* Baryshnikov, 1985), группа малых пещерных медведей, включающая малого (*U. savini* Andrews, 1922) и русского (*U. rossicus* Borissiak, 1930) пещерных медведей, и группа больших пещерных медведей, включающая европейского (*U. spelaeus* Rosenmüller, 1794) и уральского (*U. kanivetz* Vereshchagin, 1973) пещерных медведей [1–4]. Наиболее плохо изученной на сегодняшний день является

группа малых пещерных медведей (*U. ex gr. savini-rossicus*) из-за ограниченности молекулярных данных и отсутствия таксономической ревизии. Малый пещерный медведь (*U. savini*) впервые был описан в 1922 г. Чарльзом Эндрюсом из местонахождения Bacton Forest Bed в Англии [5]. Десять лет спустя А.А. Борисьяк описал мелкую форму пещерного медведя с территории Северного Кавказа (Краснодарский край) и назвал ее *U. spelaeus rossicus* [6]. В 1973 г. Н.К. Верещагин описал костные остатки мелкого медведя из пещеры Кизеловская как *U. uralensis* [7]. Позднее медведь из Кизеловской пещеры стал рассматриваться в качестве подвида *U. rossicus uralensis* [8]. В 2007 г. Г.Ф. Барышников [9] выделяет три подвида малого пещерного медведя: *U. savini savini* (Великобритания и Германия), *U. s. rossicus* (степная зона от Украины до Забайкалья) и *U. s. uralensis* (Средний Урал). Позднее Н. Спассов на основе изучения серийного краниологического материала из Болгарии предложил разделить мелких пещерных медведей на 2 вида: *U. savini* (который включает в себя *U. rossicus*) и *U. uralensis* [10]. В новых работах

¹ Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный педагогический университет, Екатеринбург, Россия

³ Зоологический музей МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: djulfa250@rambler.ru

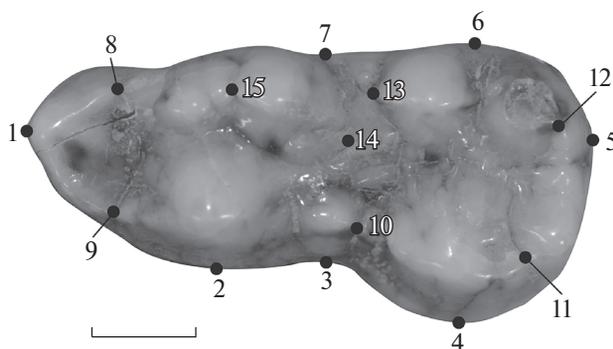


Рис. 1. Расположение точек на окклюзиальной поверхности m1 пещерных медведей. Масштаб 1 см.

Г.Ф. Барышников [2, 3] рассматривает *U. savini* и *U. rossicus* как два самостоятельных вида, последний из которых включает подвид *U. r. uralensis*. На сегодняшний день группа малых пещерных медведей нуждается в ревизии на основании морфологического изучения ископаемых образцов и проведении новых молекулярно-генетических исследований. Поэтому в данной публикации мы рассматриваем малого пещерного медведя как группу *savini-rossicus* (*U. ex gr. savini-rossicus*). По сравнению с большим пещерным медведем малый пещерный медведь является почти не изученным видом, в том числе мало данных о его географическом распространении. На данный момент в музее Института экологии растений и животных УрО РАН собрано большое количество костных остатков пещерных медведей из местонахождений Северного, Среднего и Южного Урала. Это дает возможность оценить особенности распространения малого пещерного медведя на Урале.

Исследовано 232 зуба из 17 местонахождений Урала. Материалы из 12 местонахождений либо не были изучены ранее, либо нуждаются в проверке их принадлежности к тому или иному таксону. На основе радиоуглеродных дат и биостратиграфических данных все местонахождения с остатками пещерных медведей датируются началом и серединой (морская изотопная стадия (МИС) 5e – МИС 3) позднего плейстоцена [11–18].

Применены методы классической и геометрической морфометрии. В морфометрическом анализе использовались признаки, опубликованные ранее: наибольшая длина зуба и ширина талонида [9]. Морфометрические данные анализировались с помощью двумерных графиков. Расчеты выполнены в программе Past 2.17 [19]. Из литературных источников известно, что размеры зубов большого пещерного медведя значительно превосходят размеры зубов малого пещерного медведя [6, 9, 10]. Для проверки этого заключения были использованы две группы данных о размерах m1 известной

таксономической принадлежности. Первая группа включает выборки зубов большого пещерного медведя (*U. kanivetz*) из пещер Среднего (Тайн (слой 1), Геологов 3) и Южного (Победа, Игнатьевская (слои 2–9), Заповедная) Урала [13–15]. Вторая группа включает выборки зубов малого пещерного медведя (*U. ex gr. savini-rossicus*) из ряда местонахождений: пещеры Иманай [16], Краснотара [6], Сибири [9], Bacton Forest Bed [9], пещеры Кизеловская [9].

Исследование формы m1 проведено по 14 точкам, расположенным на окклюзиальной поверхности зуба. Точки 1–7 маркируют антериальный, постериальный, буккальный и лингвальный края коронки. Точки 8 и 9 маркируют границы параконида, точки 13 и 10 располагались в зоне контакта тригониды и талонида. Точки 11 и 12 маркируют края гипоконида и энтокониды. Точки 14 и 15 характеризуют границы главного бугра метаконадного комплекса (рис. 1). Для получения переменных формы проводили прокрустов анализ на координатах 14 точек. Для выявления структуры изменчивости данных провели анализ главных компонент на прокрустовых координатах. Расчеты выполнены в программе MorphoJ 1.07 [20].

Наши исследования подтвердили, что зубы большого и малого пещерных медведей хорошо различаются по размерам. Выборки зубов пещерных медведей с известной таксономической принадлежностью образовали две слабо перекрывающиеся между собой размерные группы (рис. 2).

Первую группу (отличающуюся небольшими размерами) сформировали зубы *U. ex gr. savini-rossicus*, вторую группу (с более крупными размерами) сформировали зубы *U. kanivetz*. Зубы из 12 местонахождений попали в одну из образованных групп (рис. 2), что послужило основанием для определения их таксономической принадлежности. По форме m1 выборки разделились хуже (рис. 3). Можно заключить, что определение таксономической принадлежности пещерных мед-

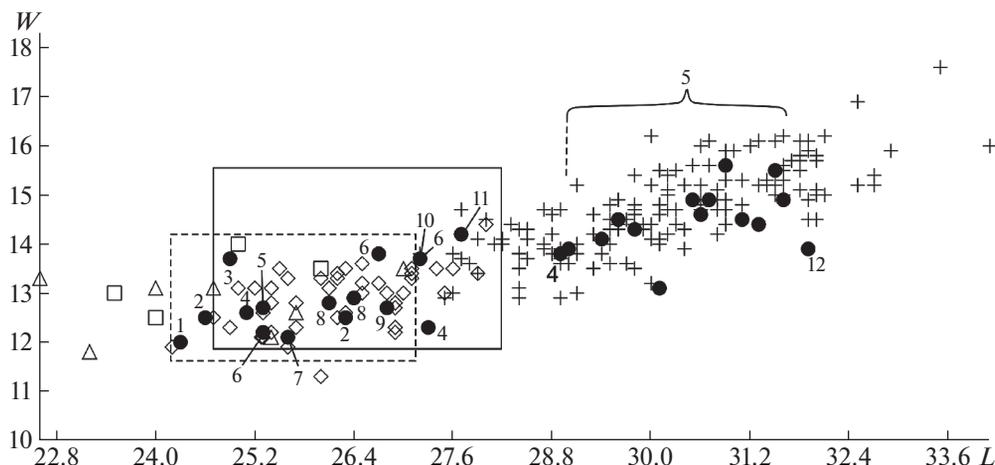


Рис. 2. Отношение наибольшей длины (L) к ширине талонида (W) m1 пещерных медведей, в мм. Крест — *U. kanivetz* из местонахождений Урала, ромб — *U. ex gr. savini-rossicus* из пещеры Иманай, квадрат — *U. ex gr. savini-rossicus* из местонахождения близ Краснодара [6], треугольник — *U. ex gr. savini-rossicus* из местонахождений Сибири [9]. Сплошная линия (прямоугольник) показывает границы изменчивости размеров m1 *U. ex gr. savini-rossicus* из местонахождения Vastop Forest Bed [9]. Пунктирная линия (прямоугольник) показывает границы изменчивости размеров m1 *U. ex gr. savini-rossicus* из пещеры Кизеловская [9]. Черный круг — пещерные местонахождения Урала: 1 — Кизеловская, 2 — Махневская Ледяная, 3 — Медвежья, 4 — Барсучий дол, 5 — Виашер, 6 — Чудесница, 7 — Тайн (слой 2), 8 — Сказка, 9 — Динамитная, 10 — Игнатьевская (10 слой), 11 — Черные кости, 12 — Куаламатская.

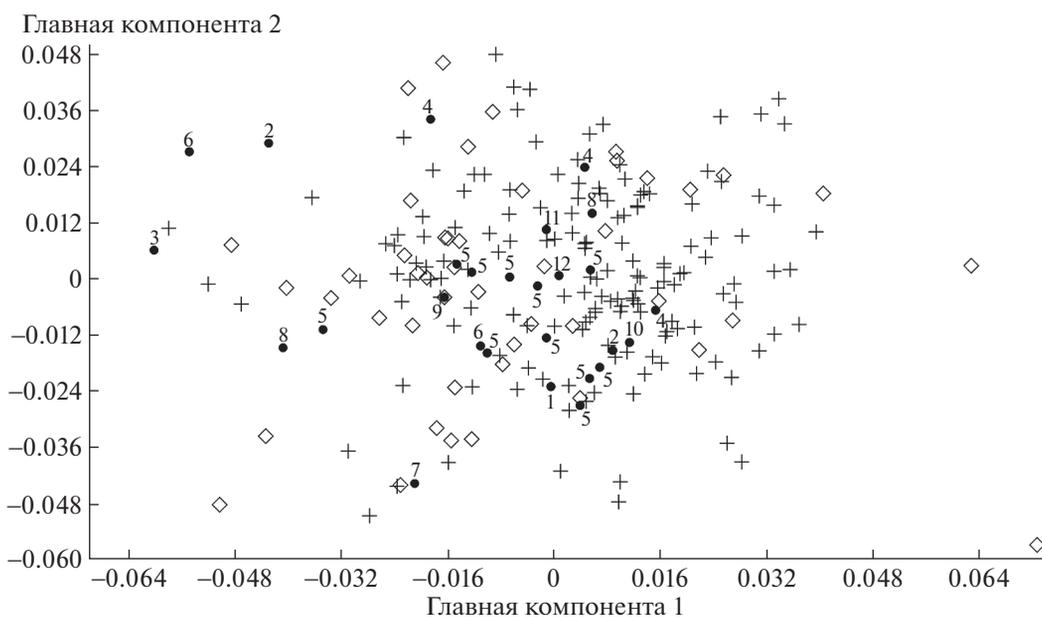


Рис. 3. Результаты анализа формы m1 пещерных медведей методом главных компонент. Крест — *U. kanivetz* из местонахождений Урала, ромб — *U. ex gr. savini-rossicus* из пещеры Иманай. Черный круг — пещерные местонахождения Урала: 1 — Кизеловская, 2 — Махневская, 3 — Медвежья, 4 — Барсучий дол, 5 — Виашер, 6 — Чудесница, 7 — Тайн (слой 2), 8 — Сказка, 9 — Динамитная, 10 — Игнатьевская (10 слой), 11 — Черные кости, 12 — Куаламатская.

ведей методом геометрической морфометрии по предложенной нами форме m1 значительно уступает возможности их дифференциации по размерам зуба и может служить только вспомогательным методом.

В результате исследований подтверждено присутствие *U. kanivetz* и *U. ex gr. savini-rossicus* в местонахождении пещера Медвежья [14] на Северном Урале. Для обоих таксонов это самая северная точка (62°05' с.ш., 58°05' в.д.) их ареалов на

Урале. Впервые установлено наличие малого пещерного медведя в фаунах из пещер Виашер, Динамитная, Чудесница и, вероятно, Черные кости и подтверждено его наличие в фауне из пещеры Махневская ледяная [17] на Среднем Урале. На Южном Урале впервые установлено наличие малого пещерного медведя в фауне из пещеры Сказка и подтверждено его присутствие в фаунах из пещер Барсучий Дол [18], Аша 1 [13, 14] и Игнatieвская пещера (слой 10) [13]. Впервые установлено, что костные остатки пещерного медведя из пещеры Куаламатская принадлежат *U. kanivetz*.

В результате исследования размеров и формы m1 пещерных медведей впервые установлено, что малый пещерный медведь присутствует в фаунах из пещер Сказка, Виашер, Динамитная, Чудесница и Черные кости. Подтверждено, что *U. kanivetz* и *U. ex gr. savini-rossicus* обитали на Северном, Среднем и Южном Урале. В ряде местонахождений их остатки найдены в составе одних фаун, что указывает на перекрывание их ареалов на Урале. Время их совместного обитания составляет от начала (микулинское, казанцевское межледниковье; МИС 5e) до середины (середина брянского, каргинского интерстадиалов; середина МИС 3) позднего плейстоцена.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00041) и частичной поддержке РФФИ № 19-04-00111-а, № 19-04-00507.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rabeder G., Pacher M., Withalm G. Early Pleistocene bear remains from Deutsch-Altenburg (Lower Austria) // Mitt. Komm. Quartärkomm. Österr. Akad. Wiss. 2010. V. 17. P. 1–135.
2. Baryshnikov G.F., Puzachenko A.Y. Morphometry of upper cheek teeth of cave bears (Carnivora, Ursidae) // Boreas. 2019. V. 48. № 3. P. 581–604.
3. Baryshnikov G.F., Puzachenko A.Y. Morphometry of lower cheek teeth of cave bears (Carnivora, Ursidae) and general remarks on the dentition variability // Boreas. 2020. V. 49. № 3. P. 562–593.
4. Барышников Г.Ф. Кударский пещерный медведь: эволюция, тафономия, вымирание // Записки института истории материальной культуры. 2020. Вып. 22. С. 158–175.
5. Andrews C.W. XXII. Note on a bear (*Ursus savini* sp. n.) from the Cromer Forest-bed // Journal of Natural History. 1922. V. 9. № 50. P. 204–207.
6. Борисяк А.А. Новая раса пещерного медведя из четвертичных отложений Сев. Кавказа // Труды палеозоологического института. 1932. Т. 1. С. 137–201.
7. Верещагин Н.К. Краниологическая характеристика современных и ископаемых медведей // Зоологический журнал. 1973. Т. 52. № 6. С. 920–930.
8. Vereschagin N., Baryshnikov G. Small cave bear *Ursus* (Spelearctos) *rossicus uralensis* from the Kizel Cave in the Ural (Russia) // Geoloski zbornik. 2000. V. 15. P. 53–66.
9. Барышников Г.Ф. Семейство медвежьих (Carnivora, Ursidae). СПб.: Наука; 2007.
10. Spassov N., Hristova L., Ivanova S., Georgiev I. First record of the “small cave bear” in Bulgaria and the taxonomic status of bears of the *Ursus savini* Andrews – *Ursus rossicus* Borissiak group // Fossil Imprint. 2017. V. 73. P. 275–291.
11. Pacher M., Stuart A. J. Extinction chronology and palaeobiology of the cave bear (*Ursus spelaeus*) // Boreas. 2009. V. 38. P. 189–206.
12. Barlow A., Paijmans J.L.A., Federica A., et al. Middle Pleistocene genome calibrates a revised evolutionary history of extinct cave bears // Current Biology. 2021. V. 31. № 8. P. 1771–1779.
13. Смирнов Н.Г., Большаков В.Н., Косинцев П.А., и др. Историческая экология животных Южного Урала. Свердловск: УрО АН СССР; 1990.
14. Kosintsev P.A., Gasilin V.V., Gimranov D.O., Bachura O.P. Carnivores of the Ural in the late pleistocene and holocene // Quaternary International. 2016. V. 420. P. 145–155.
15. Baryshnikov G., Gimranov D., Kosintsev P. Variability of the upper incisors in the cave bears (Carnivora, Ursidae) from the Caucasus and Urals // Comptes Rendus Palevol. 2019. V. 18. № 2. P. 209–222.
16. Gimranov D.O., Kosintsev P.A. Quaternary large mammals from the Imanay Cave // Quaternary International. 2020. V. 546. P. 125–134.
17. Fadeeva T., Kosintsev P., Lapteva E., et al. Makhnevskaya Ledyanaya Cave (Middle Urals, Russia): Biostratigraphical Reconstruction // Quaternary International. 2020. V. 546. P. 135–151.
18. Kosintsev P.A., Yakovlev A.G., Plasteeva N.A., Gimranov D.O. Mammalian fauna from the Barsuchiy Dol Cave (the Southern Urals) // Russian Journal of Theoretical Biology. 2021. In Press.
19. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontologia Electronica. 2001. V. 4. № 1. P. 1–8.
20. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics // Molecular Ecology Resources. 2011. V. 11. P. 353–357.

NEW DATA ON THE DISTRIBUTION OF THE SMALL CAVE BEAR (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) IN THE URALS

D. O. Gimranov^{a,#}, M. V. Pavlova^b, O. G. Nanova^c, P. A. Kosintsev^a,
and Corresponding Member of the RAS N. G. Smirnov^a

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

^b Urals State Pedagogical University, Yekaterinburg, Russian Federation

^c Zoological Museum of M.V. Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

#e-mail: djulfa250@rambler.ru

The lower molar (m1) of cave bears from Late Pleistocene localities of the Urals was studied employing methods of traditional morphometry and geometric morphometrics. We found based on both size and shape variation of m1 that the small cave bear (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) was part of the faunas from the caves Skazka, Viasher, Dynamitnaya, Chudesnitsa and Chernye kosti. The small cave bear presence in faunas from the Medvezhya, Makhnevskaya Ledyanaya, Asha 1, Ignatievskaya and Barsuchii Dol caves was confirmed as well. The range of the small cave bear (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) occupied the Northern, Middle, and Southern Urals in the Late Pleistocene. The ranges of the small cave bear and cave bear (*Ursus kanivetz*) overlapped from the beginning (marine isotope stage 5e) to the middle (middle marine isotope stage 3) of the Late Pleistocene.

Keywords: *Ursus savini*, *Ursus rossicus*, *Ursus kanivetz*, small cave bear, Pleistocene, lower molar, Ural, distribution, areal

УДК 57.034:574.24:57.04

УЛЬТРАДИАННЫЕ РИТМЫ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА СВЯЗАНЫ С ОСОБЕННОСТЯМИ ПОВЕДЕНИЯ У ЗЕЛЕНУШКИ (*Chloris chloris*, Fringillidae, Aves)

© 2021 г. М. Е. Диатропов^{1,*}, А. С. Опаев¹, член-корреспондент РАН А. В. Суров¹

Поступило 09.03.2021 г.

После доработки 24.03.2021 г.

Принято к публикации 24.03.2021 г.

Ранее у самцов зеленушки нами выявлены ультрадианные ритмы температуры тела, которые группируются в нескольких частотных диапазонах (3–6, 8–10, 12–20, 40–60 мин). При этом выделялась группа птиц, у которых доминируют 3–7-минутные ритмы – у них низкий коэффициент отношения средней спектральной плотности гармоник в диапазоне 12–20 мин к аналогичному показателю для 3–7 мин. В настоящей работе мы проверяли гипотезу о связи ритмов температуры тела с активностью нервной системы, а именно – с поведением и темпераментом. Проведено две серии поведенческих тестов – для оценки уровня агрессивности ($n = 12$ самцов) и реакции на новизну ($n = 17$). Оказалось, что особи, у которых преобладают ритмы в диапазоне 3–7 мин, менее агрессивны и медленнее привыкают к новым условиям. Таким образом, установлена связь между особенностями поведения, темпераментом и ультрадианными ритмами температуры тела у зеленушек.

Ключевые слова: ультрадианные ритмы, температура тела, темперамент, зеленушка

DOI: 10.31857/S2686738921040089

Цикличность характерна для многих процессов в живой природе. Часто она совпадает с цикличностью в проявлении абиотических факторов – например, сезонностью или чередованием темного и светлого времени суток. Но известны и ультрадианные ритмы с периодом менее 24 ч. Они изучены хуже, их функциональное значение менее понятно [1]. Проявления ультрадианной ритмики могут затрагивать, например, уровень гормонов в крови, двигательную активность, сердцебиение [2–4], а также температуру тела.

Ранее мы изучали температуру тела у зеленушки (*Chloris chloris*) [5]. У этого вида ночью температура на 4–5°C ниже, чем днем (рис. 1а). Днем выявлены ультрадианные ритмы с амплитудой не более 0.3–0.5°C (рис. 1б). У большинства самцов такие ритмы группируются в нескольких частотных диапазонах, их периоды составляют около 40–60, 16–20, 11–13, 6–8 и 3–5 мин. Амплитуда ритмов имеет индивидуальную изменчивость. В частности, некоторые самцы выделялись выраженными 3–7-минутными ритмами (красная линия на рис. 1б).

Динамика температуры тела в диапазоне около 3–20 мин как у животных, так и у человека определяется, вероятно, тонусом вегетативной нервной системы: блокада как симпатических, так и парасимпатических влияний приводит к исчезновению колебаний [6]. Одним из эффективных физиологических методов для оценки регуляторных влияний вегетативной нервной системы, в частности на сердце, является вариабельность сердечного ритма [7]. Этот метод применяется не только при исследовании деятельности сердечно-сосудистой системы, но и для оценки адаптационных возможностей всего организма, отражающегося в балансе симпатических/парасимпатических реакций. Важным показателем в методике оценки вариабельности сердечного ритма является соотношение высоко- и низкочастотных ритмических изменений временных интервалов между сердечными сокращениями. Мы предположили, что аналогичный прием анализа ритмических изменений температуры тела, но в более низкочастотном диапазоне периодов, может быть информативен для оценки баланса автономной нервной системы, лабильность которой связана с понятием силы процессов возбуждения и торможения центральной нервной системы. Следовательно, индивидуальные характеристики ритмики температуры тела могут быть связаны с темпераментом животных и/или их поведением. В

¹ ФГБУН “Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН”, Москва, Россия

*e-mail: diatrom@inbox.ru

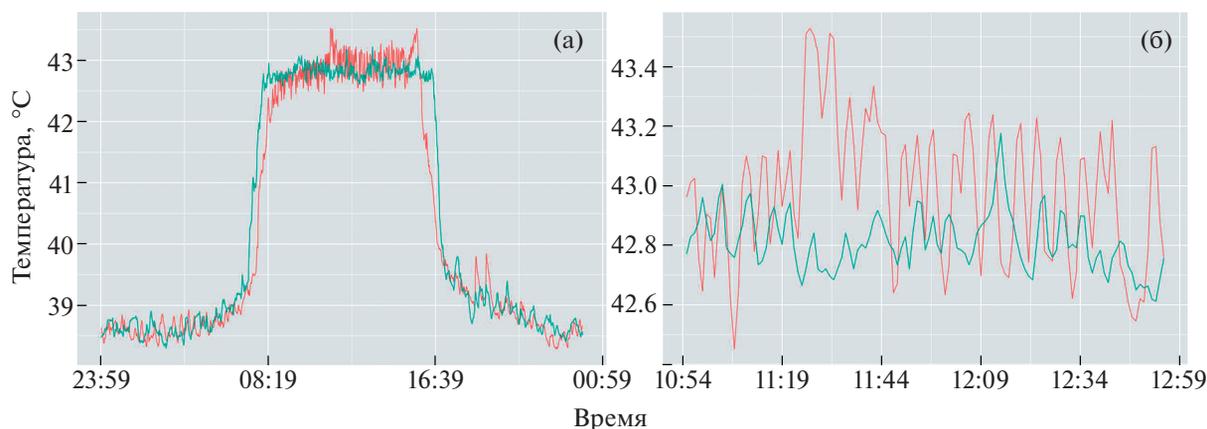


Рис. 1. Динамика температуры тела зеленушек в течение суток (а) и за два дневных часа тех же суток (б). Приведены данные для двух самцов — с коротким (красная линия) и протяженным (синяя линия) желтым полем на рулевом пере.

данной работе мы соотнесли особенности поведения самцов зеленушки, имеющих разную выраженность ультрадианных ритмов изменения температуры тела в диапазоне 3–20 мин.

Зеленушек отловили в сентябре–октябре 2019 и 2020 г. в с. Ярустово (Рязанская обл.). Птиц содержали до весны следующего года в индивидуальных клетках в помещении. Зимой 2019–2020 гг. мы содержали 12 самцов, а зимой 2020–2021 гг. — 17 самцов. С целью стандартизации зимой 2020–2021 гг. исследование проводили на птицах в возрасте до года. Динамику температуры тела регистрировали в декабре: в 2019 г. изучены 9 самцов, а в 2020 г. — 14 самцов. Температуру тела регистрировали с помощью датчиков ДТН4-28 (“ЭМБИ РЕСЕРЧ”), которые имплантировали в брюшную полость на 20–40 дней. В качестве анестетика при операции использовали золетил (Virbac Sante Animale), который вводили внутримышечно из расчета 3–7 мг/кг. Датчик позволял регистрировать температуру тела каждую минуту и накапливать данные за весь период эксперимента. Спектральная плотность мощности ритмов определялась методом быстрого преобразования Фурье в программе Statistica 7.0. Далее вычисляли среднюю спектральную плотность в диапазонах периодов 12–20 и 3–7 мин, и находили их отношение (далее: отношение 12–20/3–7 мин). Этот показатель отражает выраженность амплитуды ритмов с периодами 12–20 мин по отношению к ритмам с периодами 3–7 мин.

Для оценки поведенческих особенностей разных самцов мы использовали два подхода: прямой и непрямой. В качестве непрямого метода использовали окраску оперения, которая у птиц может отражать особенности поведения и темперамента, например, уровень агрессивности или смелость ↔ трусливость [8, 9]. Мы использовали протяженность (в % от общей длины) желтого по-

ля второго с краю рулевого пера. Это перо двухцветное — его дистальная часть черная, а основание желтое. Ранее было показано, что данный признак индивидуален (стабильно различается между особями) и вероятно связан с физиологическими и/или генетическими особенностями птиц [10].

Для прямой оценки поведения проведено две серии опытов. Зимой 2019–2020 гг. изучали агрессивное поведение птиц, а зимой 2020–2021 гг. — отношение к новому предмету.

Для изучения агрессивного поведения в каждую из шести клеток посадили по два самца. “Пары” подбирались таким образом, чтобы входящие в них птицы были контрастны по протяженности желтой части рулевого пера и относились к одной возрастной когорте.

По истечении 2–3 нед в каждой клетке выявился более агрессивный доминант и подчиненный. Все подчиненные зеленушки потеряли большую часть оперения затылочной области (оно было выщипано доминантом). Доминантом во всех случаях стал самец с большей протяженностью желтой части пера. Медиана отношения 12–20/3–7 мин была больше у доминантов: 2.6 (2.3–2.9, $n = 4$) против 2.2 (1.0–2.4, $n = 5$) у подчиненных (различия достоверны по критерию Манна–Уитни: $W = 18.5$, $p = 0.049$).

Отношение к новизне изучали на 17 самцах. Опыты проводили по методике [8]. В 10 ч утра птиц лишали корма. Через 3.5 ч в клетку помещали новую кормушку яркого цвета. Отмечали время, по истечении которого птица начинала клевать из нее семена, что служило показателем отношения птицы к новизне. Если самец не подходил к кормушке в течение 30 мин, опыт прекращали. С каждым из самцов эксперимент повторяли два раза, с интервалом около 10 дней. В первой серии экспериментов кормушка была

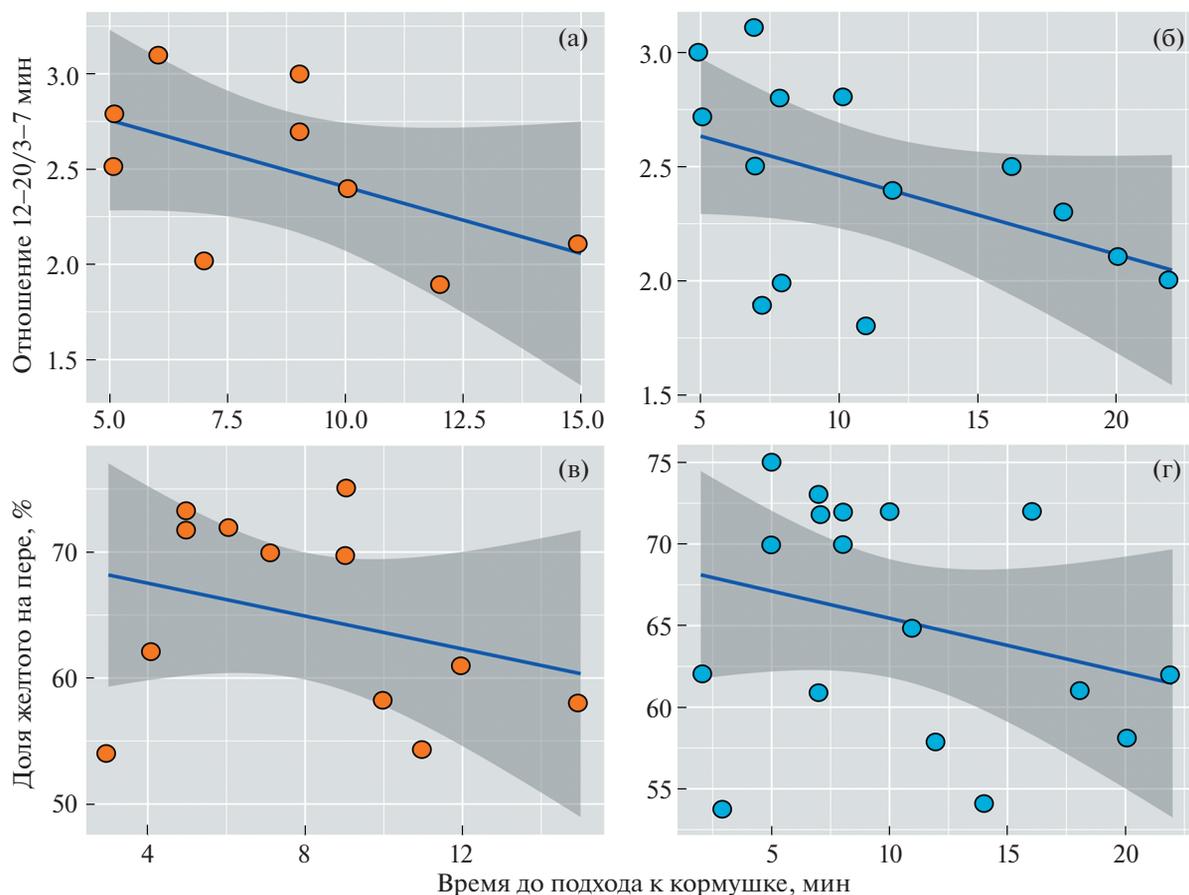


Рис. 2. Время подхода к оранжевой кормушке (а, в) в первой серии опытов, и к голубой кормушке (б, г) во второй серии опытов в зависимости от отношения 12–20/3–7 мин (вверху) и доли желтого цвета от общей длины 4-го рулевого пера (%) (внизу).

оранжевого цвета, а во второй — ярко-голубого. В опытах с оранжевой кормушкой в течение 30 мин к ней подошли 12 самцов из 17. К голубой кормушке подошли все 17 птиц. Время подхода к одной и другой кормушке коррелировало: коэффициент корреляции Спирмена $R = 0.65$, $p = 0.023$, $n = 12$. Значит, данный опыт выявляет индивидуальные особенности поведения.

Для выявления связи между отношением 12–20/3–7 мин и временем подхода к кормушке использовали обобщенные линейные модели со смешанными эффектами (GLMM). В этом анализе использовали случайный фактор: массу тела самца, измеренную ранним утром в день первого эксперимента. Это было сделано потому, что упитанность/истощенность птиц может влиять на пищевую мотивацию и результаты опыта. Время подхода к оранжевой кормушке достоверно не зависело от отношения 12–20/3–7 мин (GLMM: $DF = 7$, $t = -1.69$, $p = 0.135$, $n = 9$). А время подхода к голубой зависело (GLMM: $DF = 12$, $t = -1.81$, $p = 0.005$, $n = 14$). При этом сам характер зависимости был схож в обоих экспериментах (рис. 2а–2б).

Время подхода к оранжевой (GLMM: $DF = 10$, $t = -0.99$, $p = 0.027$, $n = 12$) и голубой (GLMM: $DF = 15$, $t = -1.13$, $p = 0.004$, $n = 17$) кормушкам достоверно зависело от протяженности желтого поля пера (рис. 2в–г).

Проведенные опыты показали, что птицы с меньшей протяженностью желтого цвета на рулевом пере (1) были подчиненными при парных ссаживаниях и (2) были более боязливы (дольше подходили к незнакомой кормушке). По данным за оба года исследования, протяженность желтого на хвосте коррелировала с отношением 12–20/3–7 мин: коэффициент корреляции Спирмена $R = 0.69$, $p < 0.001$, $n = 23$ (рис. 3). Значит, у подчиненных и боязливых птиц (мало желтого) ультрадианные ритмы температуры тела с периодичностью 3–7 мин были выражены сильнее (пример: рис. 1б).

Интересно, что доза анестетика (золетил), необходимая для обездвиживания птиц с высоким показателем доли желтого в хвосте (70–80%), была в 1.5–2 раза больше, чем для птиц с маленькой долей желтого. Это дополнительно подтверждает

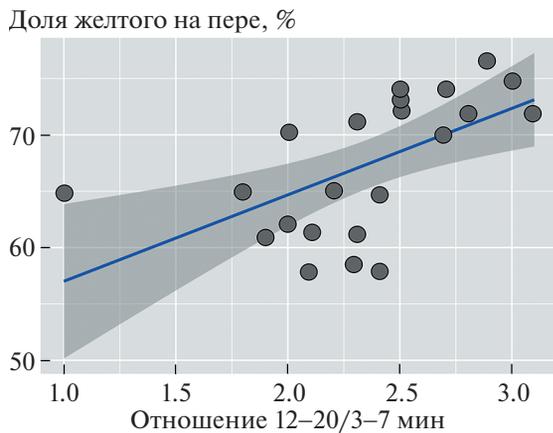


Рис. 3. Взаимосвязь отношения 12–20/3–7 мин и доли желтого цвета от общей длины 4-го рулевого пера (%).

различие в реактивности нервной системы у зеленушек с разной степенью развития желтого цвета на рулевых перьях.

Подобные данные есть и в литературе. У птенцов сипухи (*Tyto alba*) выявлена зависимость размера черных пятен оперения от продолжительности и выраженности около 4-часовых ультрадианных ритмов чередования активности/покоя [1]. Этот факт авторы связывают с различными стратегиями поведения, свойственными многим животным: проактивные и реактивные [11]. Результаты наших исследований показывают, что самцов зеленушек с маленькой площадью желтого в хвосте и выраженными 3–7-минутными колебаниями температуры можно отнести к реактивным особям, более “трусливым” и менее агрессивным.

Выявленная нами закономерность — преобладание высокочастотных колебаний в динамике ежеминутных изменений температуры тела у менее эмоционально-устойчивых особей — вероятно, определяется эндогенными причинами, связанными с особенностями функционирования вегетативной нервной системы. Однако ранее нами было показано, что на динамику изменения температуры тела влияет экзогенный фактор внешней среды [5]. В частности, установлена связь колебаний температуры тела в диапазоне 4–16 мин с R_{c5} пульсациями геомагнитного поля [12]. В нашей работе менее агрессивные птицы и боязливые в отношении новых объектов, имели более выраженные короткопериодические колебания температуры тела и, вероятно, большую чувствительность к геомагнитному полю, в отличие от особей, проявляющих склонность к доминированию и более уверенному поведению.

В данной работе мы продемонстрировали возможность оценки состояния автономной нервной системы по выраженности спектральной плотности гармоник изменения температуры те-

ла разного диапазона периодов. Этот прием может быть также применен в области исследования индивидуальных психофизиологических реакций, уровня стрессорной нагрузки и других биологических параметров, имеющих отражение в балансе симпатического/парасимпатического звена вегетативной нервной системы.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы Государственного задания ИПЭЭ РАН 0089-2021-0004 “Экологические и эволюционные аспекты поведения и коммуникации животных”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Страсбург, 1986 г.). На проведение экспериментальной работы было получено положительное заключение этической комиссии ИПЭЭ РАН № 14 от 15.01.2018 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scriba M.F., Henry I., Vyssotski A.L., Mueller J.C., Rattenborg N.C., Roulin A. // Journal of Biological Rhythms. 2017. V. 3. № 5. P. 456–468.
2. Gerkema M.P., Daan S., Wilbrink M., Hop M.W., van der Leest F. // Journal of Biological Rhythms. 1993. V. 8. Iss. 2. P. 151–171.
3. Kimura F., Tsai C.W. // Journal of Physiology. 1984. V. 353. Iss. 1. P. 305–315.
4. Tornatzky W., Cole J.C., Miczek K.A. // Physiology and Behavior. 1998. V. 63. Iss. 5. P. 845–853.
5. Дуатронтов М.Е., Панчелюга В.А., Панчелюга М.С., Суров А.В. // Доклады Российской академии Наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494. № 1. С. 472–476.
6. Braulke L.J., Heldmaier G. // Cryobiology. 2010. V. 60. № 2. P. 198–203.
7. Баевский П.М. // Успехи физиологических наук. 2006. Т. 37. № 3. С. 42–57.
8. Mateos-Gonzalez F., Senar J.C. // Animal Behaviour. 2012. V. 83. Iss. 1. P. 229–232.
9. Williams L.J., King A.J., Mettke-Hofmann C. // Animal Behaviour. 2012. V. 84. Iss. 1. P. 159–165.
10. Karu U., Saks L., Hõrak P. // Physiological and Biochemical Zoology. 2007. V. 80. № 6. P. 663–670.
11. Koolhaas J.M., Korte S.M., De Boer S.F., Van Der Vegt B.J., Van Reenen C.G., Hopster H., De Jong I.C., Ruis M.A.W., Blokhuis H.J. // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 1999. V. 23. Iss. 7. P. 925–935.
12. Дуатронтов М.Е., Ягова Н.В., Петровский Д.В., Суров А.В. // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2021. Т. 171. № 5. С. 639–634.

**ULTRADIAN RHYTHMS OF BODY TEMPERATURE
ARE RELATED TO TEMPERAMENT IN GREENFINCH
(CHLORIS CHLORIS, FRINGILLIDAE, AVES)**

M. E. Diatropov^{a,#}, A. S. Ораев^a, and Corresponding Member of the RAS A. V. Surov^a

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

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

Earlier, in males Greenfinch, we have described several rhythms of body temperature with periods of 3–6, 8–10, 12–20, and 40–60 min. There was individual variation in such rhythmicity. Rhythms with a period of 3–7 min were more characteristic for some males but not for the others. These males had small values of ratio of harmonic spectral density in the range of 12–20 min to harmonic spectral density in the range of 3–7 min. Here, we hypothesized that ultradian rhythmicity in body temperature fluctuations relates to nervous system activity in general, and to temperament in particular. We found that some males were more aggressive and approached the novel feeder quicker (they were bolder), while others were less aggressive and shyer. We found that rhythms with a period of 3–7 min were much more expressed in non-aggressive and shy males. Thus, in Greenfinch the body temperature rhythmicity was related to temperament.

Keywords: ultradian rhythms, body temperature, temperament, Greenfinch

УДК 57.01

СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 2021 г. Л. А. Сафонова¹, М. М. Боброва¹, А. Е. Ефимов¹,
О. И. Агапова¹, И. И. Агапов^{1,*}, академик РАН С. В. Готье^{1,2}

Поступило 17.03.2021 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принято к публикации 31.03.2021 г.

Разработка микроносителей для культивирования и доставки клеток является актуальной задачей тканевой инженерии и регенеративной медицины. В работе представлен новый способ модификации поверхности альгинатных микроносителей в виде микросфер диаметром 200–300 мкм. Описанный способ заключается в ковалентной пришивке коллагена к поверхности альгинатных микроносителей. Было показано, что способ позволяет полностью модифицировать поверхность альгинатного микроносителя, что может использоваться для улучшения биологических свойств микроносителя. Такие микроносители с улучшенными биологическими свойствами могут рассматриваться в качестве эффективных систем для доставки и культивирования клеток.

Ключевые слова: микроносители, альгинат, коллаген, ковалентная пришивка, клеточный носитель

DOI: 10.31857/S2686738921040211

Разработка новых технологий культивирования клеток является одной из важных задач тканевой инженерии. Для сохранения нативной морфологии клеток и межклеточных взаимодействий применяется трехмерное культивирование клеток на различных конструкциях. В качестве таких конструкций применяются как трехмерные пористые скаффолды [1–3], так и микроносители различной формы [4–6]. Помимо подложки для культивирования клеток, микроносители являются эффективным средством для доставки клеток в область поврежденной ткани или органа, так как позволяют обеспечить благоприятные условия для клеток в ходе их доставки, что значительно повышает жизнеспособность клеток [7]. Технология инкапсуляции позволяет получить

стабильные альгинатные микроносители в форме микросфер заданного диаметра, однако культивирование клеток на поверхности таких микроносителей неэффективно вследствие низкой шероховатости поверхности и отрицательного заряда альгината при физиологических условиях [6]. На данный момент охарактеризовано множество биосовместимых материалов, которые являются эффективными субстратами для культивирования клеток, таких как коллаген, эластин, хитозан и др., однако, получение микроносителей на их основе затруднено в связи с рядом природных особенностей полимеров – ограниченной растворимостью, сложностями при стабилизации и структурировании [8]. В данной работе предлагается оригинальная методика модификации поверхности альгинатных микроносителей путем ковалентной пришивки коллагена к поверхности микроносителей.

Нами разработан способ получения альгинатных микроносителей, покрытых коллагеном, выделенным из хвоста крыс породы Wistar, путем ковалентной пришивки коллагена к альгинату. Для получения альгинатных микроносителей диаметром 200–300 мкм был использован инкапсулятор модели В-390 (BUCHI Labortechnik AG, Швейцария) [6]. Активацию карбоксильных групп на поверхности альгинатных микроносителей производили путем последовательной обработки 3 мМ раствором 1-этил-3-(3-диметилами-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова” Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия

*e-mail: igor.agapov@gmail.com

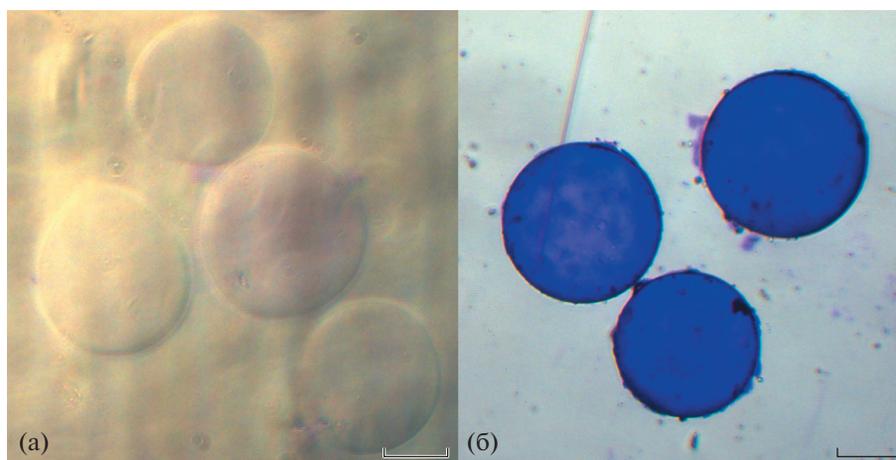


Рис. 1. Альгинатные микроносители (а) и альгинатные микроносители, поверхность которых покрыта коллагеном (б), после отмывки от красителя Кумасси R-250, световая микроскопия, изображение в проходящем свете, $\times 100$, масштабный отрезок — 100 мкм.

нопропил)карбодиимида и 10 мМ раствором N-гидроксисукцинимидом в течение 1 ч в каждом растворе [9]. Данные вещества не оказывают токсического эффекта на клетки, в отличие от глутарового альдегида или параформальдегида, которые также применяются в качестве перекрестивающих агентов, что позволяет сохранить биосовместимые свойства получаемых микроносителей. Активацию проводили при pH 6 в растворе, содержащем 5 мМ дигидрофосфата натрия и 100 мМ хлорида натрия. Далее микроносители осаждали путем центрифугирования в течение 15 мин при 1800 г и переносили в раствор аналогичного состава с pH 6. К суспензии микроносителей добавляли раствор коллагена с концентрацией 3 мг/мл, выделенного из хвостов крыс породы Wistar, в объемном соотношении микроносителей к раствору коллагена 1 : 3. Раствор коллагена получали по описанной ранее методике [10], такой раствор содержит около 60% коллагена I типа. Полученную смесь инкубировали при перемешивании в течение 12 ч при комнатной температуре. Далее полученные альгинатные микроносители, покрытые коллагеном, центрифугировали в течение 15 мин при 1800 г и переносили в раствор, содержащий 5 мМ дигидрофосфата натрия и 100 мМ хлорида натрия с pH 6. Полученные микроносители покрывали вторым слоем коллагена по аналогичному протоколу.

Для доказательства ковалентной пришивки коллагена к поверхности альгинатных микроносителей сами микроносители были окрашены красителем Кумасси R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250). Для окрашивания использовали 15-кратный раствор красителя в смеси этанола, дистиллированной воды и ледяной уксусной кислоты в объемном соотношении 4 : 4 : 1 с концентрацией 2.5 мг/мл. Перед

окрашиванием микроносители отмывали от несвязавшегося белка путем двукратного центрифугирования в течение 15 мин при 1800 г в дистиллированной воде. Затем микроносители переносили в однократный раствор красителя на 30 мин и отмывали аналогичным путем. Таким образом была доказана ковалентная пришивку коллагена к поверхности альгинатных микроносителей. На рис. 1б представлено изображение окрашенных микроносителей. Было выявлено равномерное окрашивание поверхности микроносителей. Также важно отметить, что производственные манипуляции по модификации поверхности не приводят к разрушению микроносителей, их деформации и агрегации. Альгинатные микроносители были окрашены аналогичным способом, микроносители также сохранили характерные размеры и форму, однако окрашивания выявлено не было (рис. 1а).

Коллаген I типа является самым распространенным белком межклеточного матрикса и играет ключевую роль в поддержании его структурной и функциональной целостности, а также является важной функциональной биомолекулой. Молекула коллагена содержит последовательности аминокислот, которые обеспечивают специфическое связывание с рецепторами-интегринами на поверхности клеток. Такое взаимодействие приводит к активации внутриклеточных цитоплазматических сигнальных каскадов. Адгезия клеток, обусловленная взаимодействием с интегринными, играет ключевую роль во многих биологических процессах, таких как эмбриогенез, поддержание гомеостаза и формирование и регенерация тканей [11]. Таким образом, введение коллагена в состав конструкций для тканевой инженерии и регенеративной медицины может значительно увеличить жизнеспособность клеток на поверхности

микроносителей. Кроме того, разработанный протокол модификации может быть адаптирован для получения альгинатных микроносителей с поверхностью, модифицированной различными белками и их комплексами, что позволит получить широкий спектр микроносителей с различными свойствами для культивирования и доставки клеток для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена частично при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-2598.2020.7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Panas-Perez E., Gatt C.J., Dunn M.G.* Development of a silk and collagen fiber scaffold for anterior cruciate ligament reconstruction // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013. V. 24. P. 257–265.
2. *She Z., Jin C., Huang Z., et al.* Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008. V. 19. P. 3545–3553.
3. *Soffer L., Wang X., Zhang X., et al.* Silk-based electrospun tubular scaffolds for tissue-engineered vascular grafts // *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. 2008. V. 19. N5. P. 653–664.
4. *Kotliarova M., Goncharenko A., Arkhipova A., et al.* Microcarriers based on silk fibroin for cultivation and directional osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // *FEBS Journal*. 2017. V. 284. P. 382.
5. *Боброва М.М., Сафонова Л.А., Ефимов А.Е., и др.* Микроносители в виде волокон из натурального шелка для культивирования клеток // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020. Т. 22. № 4. С. 98–104.
6. *Efimov A.E., Agapova O.I., Safonova L.A., et al.* Cryo scanning probe nanotomography study of the structure of alginate microcarriers // *RSC Advances*. 2017. № 7. P. 8808–8815.
7. *Quittet M.S., Touzani O., Sindji L., et al.* Effects of mesenchymal stem cell therapy, in association with pharmacologically active microcarriers releasing VEGF, in an ischaemic stroke model in the rat // *Acta Biomaterialia*. 2015. V. 15. P. 77–88.
8. *Vepari C., Kaplan D.L.* Silk as a Biomaterial // *Progress in Polymer Science*. 2007. V. 32. P. 991–1007.
9. *Wang Y., Fan S., Li Y., et al.* Silk fibroin/sodium alginate composite porous materials with controllable degradation // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. V. 1. № 150. P. 1314–1322.
10. *Сафонова Л.А., Боброва М.М., Агапова О.И., и др.* Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка // *Современные технологии в медицине*. 2015. Т. 7. № 3. С. 6–13.
11. *Luo J., Tong Y.* Self-Assembly of Collagen-Mimetic Peptide Amphiphiles into Biofunctional Nanofiber // *ACS Nano*. 2011. V. 5. № 10. P. 7739–7747.

SURFACE MODIFICATION OF ALGINATE MICROCARRIERS FOR IMPROVEMENT OF THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

L. A. Safonova^a, M. M. Bobrova^a, A. E. Efimov^a, O. I. Agapova^a,
I. I. Agapov^{a, #}, and academician of the RAS S. V. Gautier^{a, b}

^a *Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

^b *Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

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

The obtaining of microcarriers for the cell culture and delivery is an urgent task of tissue engineering and regenerative medicine. The novel method of surface modification of alginate microcarriers in the form of microspheres with a diameter of 200–300 μm was developed. The described method consists in covalent crosslinking between collagen and surface of alginate microcarriers. It was shown that the method makes it possible to completely modify the surface of the alginate microcarrier, which can be used to improve the biological properties of the microcarrier. Such microcarriers with improved biological properties can be considered as effective systems for cell delivery and culture.

Keywords: microcarriers, alginate, collagen, covalent crosslinking, cell carrier

УДК 568:24:598.24:598.25

ДЮКТАЙСКИЙ ГУСЬ (*Anser djuktaiensis*) И ЧЕРНЫЙ ЖУРАВЛЬ (*Grus monacha*) В ПЛЕЙСТОЦЕНЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ

© 2021 г. Н. В. Зеленков^{1,*}, Г. Г. Боескоров²

Представлено академиком РАН А.В. Лопатиным

Поступило 05.04.2021 г.

После доработки 09.04.2021 г.

Принято к публикации 12.04.2021 г.

Впервые изучены кости птиц из позднего плейстоцена (31–24 тыс. л. н.) стоянки Ихине-2 (Центральная Якутия) — одного из ключевых памятников верхнего палеолита Северо-Восточной Сибири. Данная ассоциация птиц — самая северная и самая древняя для плейстоцена Восточной Сибири. Среди материалов по птицам особый интерес представляют корактоиды вымершего дюктайского гуся (*Anser djuktaiensis*) и черного журавля (*Grus monacha*). Дюктайский гусь — крупная птица мамонтовой фауны, первоначально описанная из более молодых отложений (12–13 тыс. л. н.) юго-восточной Якутии. Это вторая находка вида на территории России, существенно расширяющая представления о географии и времени его распространения. Черный журавль — редкий современный вид с ограниченным ареалом, впервые найденный в палеонтологической летописи. Данная находка указывает на северное распространение этого вида во время каргинского интерстадиала позднего плейстоцена. Также в памятнике найдены кости чирка-свистунка и сизой чайки.

Ключевые слова: ископаемые птицы, вымершие виды, верхний плейстоцен, Восточная Сибирь

DOI: 10.31857/S2686738921040272

Четвертичная история авифаун севера Восточной Сибири остается практически не изученной [1, 2]. Для данного обширного региона репрезентативные фауны птиц известны только из позднего плейстоцена—голоцена Дюктайской палеолитической стоянки в юго-восточной Якутии [3–5], а также из позднего голоцена Дежневского поселения древних эскимосов на Чукотке [6]. Плейстоценовые находки птиц в северо-восточной Азии представлены, помимо дюктайской фауны, только остатками белых куропаток (*Lagopus lagopus*) и рогатого жаворонка (*Eremophila alpestris*) в позднем плейстоцене северной Якутии [1, 7], а также полярной гагары (*Gavia immer*) в нижнем плейстоцене Чукотки [1].

Большое значение для понимания таксономического состава и динамики позднеплейстоцено-

вых фаун птиц северо-восточной Азии имеют материалы из Дюктайской стоянки в юго-восточной Якутии, откуда были определены 66 современных видов птиц [4]. В дюктайской фауне присутствует ряд видов птиц, в настоящее время не встречающихся в регионе и приуроченных к более южным степным областям Восточной Азии (например, *Podiceps cristatus*; *Otis tarda* [4]). Из Дюктайской стоянки также были описаны первые для четвертичной фауны России ископаемые виды птиц — маленький крохаль *Mergellus mochanovi* Zelenkov et Kurochkin, 2014, и очень крупный дюктайский гусь *Anser djuktaiensis* Zelenkov et Kurochkin, 2014 [3, 5]. Географическое и временное распространение этих вымерших видов остается не изученным — предполагалось, что дюктайский гусь мог иметь широкий ареал в Евразии и быть типичным представителем мамонтовой фауны [5], однако формально к этому виду только недавно были отнесены предположительно плейстоценовые остатки очень крупного гуся из Нидерландов [8].

В этой работе описаны остатки птиц из верхнепалеолитического памятника Ихине-2 в центральной Якутии. Эта стоянка, содержащая верх-

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

² Институт геологии алмаза и благородных металлов Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, Россия

*e-mail: nzelen@paleo.ru

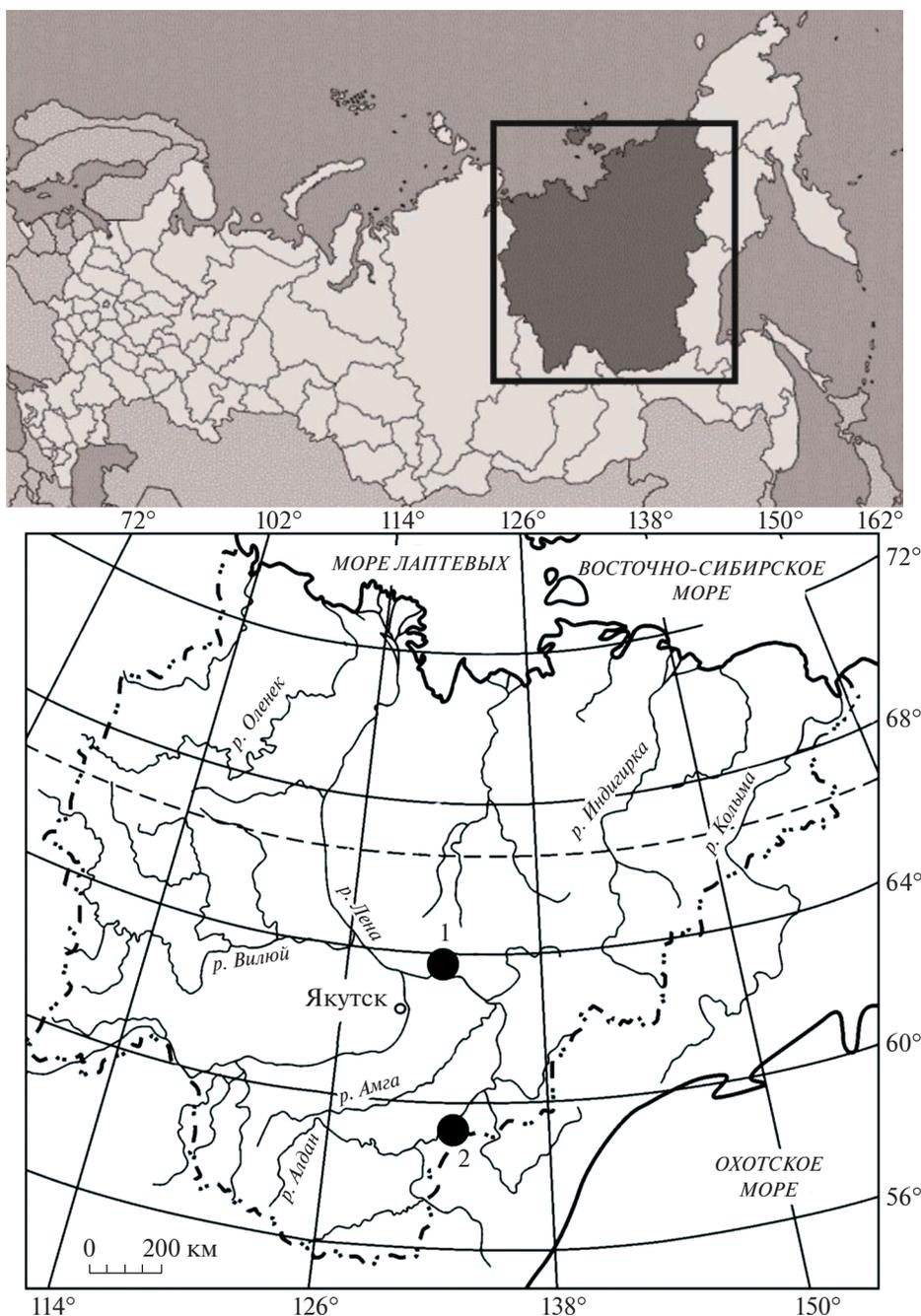


Рис. 1. Географическое расположение местонахождений Ихине-2 (1) и Дюктайская стоянка (2) на Карте Якутии.

непалеолитическую индустрию, расположена на правом берегу реки Алдан в 284 км от его устья (рис. 1). Ихине-2 открыта в 1965 г. археологами С.А. Федосеевой и Ю.А. Мочановым. На стоянке Ихине-2, имеющей радиоуглеродные датировки, которые помещают ее в каргинское время (31 200–24 330 лет), обнаружено значительное число костей млекопитающих – типичных представителей мамонтовой фауны (волк *Canis lupus*,

песец *Vulpes lagopus*, шерстистый мамонт *Mammuthus primigenius*, шерстистый носорог *Coelodonta antiquitatis*, лошадь *Equus* sp., северный олень *Rangifer tarandus* и степной бизон *Bison priscus*) [9, 10]. Среди этих остатков имеется и несколько костей птиц, до сих пор оставшихся не изученными и составивших предмет настоящего исследования.

Использованы следующие сокращения: ИГАБМ СО РАН – Институт геологии алмаза и благород-



Рис. 2. Коракоиды дюктайского гуся и черного журавля: А – *Grus monacha*, экз. без № ОА ИЯЛИ, местонахождение Ихине-2, Центральная Якутия, верхний плейстоцен; Б – *Grus monacha*, экз. ПИН 55-3-2, современный; В – *Anser djuktaiensis*, голотип ПИН 2859/703, местонахождение Дюктайская стоянка, юго-восточная Якутия, верхний плейстоцен–голоцен; Г – *Anser djuktaiensis*, экз. № 324 ОА ИЯЛИ; местонахождение Ихине-2, Центральная Якутия, верхний плейстоцен. А, Б – с дорсальной стороны; В, Г – с вентральной стороны.

ных металлов СО РАН, Якутск; ОА ИЯЛИ – отдел археологии Института языка, литературы и истории СО РАН, Якутск; ПИН – Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва.

Материалы по птицам из Ихине-2 представлены несколькими костями, среди которых две находки представляют значительный интерес: коракоид очень крупного вымершего гуся *A. djuktaiensis* и коракоид черного журавля *Grus monacha* (рис. 2). Костные остатки журавлей в плейстоценовых отложениях довольно редки, при этом описанная в данной работе находка черного журавля – первая в палеонтологической летописи. Дюктайский гусь на территории России ранее был известен только из отложений Дюктайской палеолитической стоянки [5].

Практически полный очень крупный правый коракоид гуся из Ихине-2 (экз. № 324 ОА ИЯЛИ) принадлежит представителю Anatidae и характеризуется отчетливо выраженным округлым и вогнутым *cotyla scapularis*, отсутствием *foramen n. suprascoracoidei*, некрупным *processus procoracoideus* и явными отпечатками *musculus sternocoracoideus* на дорсальной поверхности *extremitas sternalis*. Он отнесен нами к *Anser djuktaiensis* на основании размеров и общей робустности. Наибольшая длина сохранившегося фрагмента – 80.3 мм. Реконструируемая наибольшая длина этого экземпляра составляет не менее 84 мм, что соответствует голотипу *A. djuktaiensis* из Дюктайской пещеры, имеющему длину 84.2 мм [5]. По-

добный размер соответствует верхам изменчивости современных диких самцов *Anser anser* [11], при этом лишь у единичных современных экземпляров максимальная длина коракоида превышает 80 мм [12]. Наиболее характерной чертой коракоида *Anser djuktaiensis* является робустный стержень – у экземпляра из Ихине минимальная медиолатеральная ширина стержня составляет 10.5 мм, что соответствует таковой коракоидов из Дюктайской стоянки [5].

Второй крупный коракоид из Ихине-2 (экз. без № ОА ИЯЛИ) принадлежит представителю семейства *Gruidae* и характеризуется мелкой и неоформленной *cotyla scapularis*, очень робустным стержнем, наличием *foramen nervi suprascoracoidei*, крупным *processus procoracoideus* с краниально ориентированной вершиной и отчетливо выступающим медиально *angulus medialis*. В краниальной части *extremitas sternalis* видно углубление, соответствующее развитому у *Gruidae* пневматическому отверстию. По общим размерам данный образец соответствует современным черному журавлю (*Grus monacha*) и красавке (*G. virgo*), отличаясь от других видов заметно более мелкими размерами. По размеру суставной части (длина *facies articularis humeralis* + *cotyla scapularis*) ископаемый экземпляр точно соответствует *G. monacha*. Красавка характеризуется более мелкой суставной областью коракоида, что отражает заметно меньший вес тела у этого современного вида – у птиц вес тела отчетливо коррелирует с

размерными характеристиками гленоидной части коракоида [13].

Кроме того, в сборах из Ихине-2 представлены правая плечевая кость чирка-свистунка (*Anas crecca*) и левый карпометакарпус сизой чайки (*Larus canus*), не отличимые по размерам и морфологии от соответствующих костей современных представителей указанных видов. Оба вида в настоящее время обычны в центральной Якутии и на севере Восточной Сибири в целом [14].

Фауна птиц из Ихине — самая северная и самая древняя известная ассоциация ископаемых птиц плейстоценового возраста на территории всей Восточной Сибири. Она впервые проливает свет на сообщества птиц центральной Якутии в период каргинского интерстадиала и указывает на заметно более северное распространение видов, населяющих в настоящее время или населявших во время последнего ледникового максимума более южные области региона. Так, дюктайский гусь ранее был известен только из Дюктайской стоянки, удаленной от Ихине практически на 500 км (рис. 1). Черный журавль — редкий восточносибирский вид, современный гнездовой ареал которого охватывает Нижнее Приамурье и несколько изолированных очагов в горах и на плато южной и юго-западной Якутии [14]. Ближайший современный очаг гнездования приурочен к среднему течению Алдана (долина нижнего течения реки Мая; [15]) и удален от месторасположения стоянки Ихине-2 по меньшей мере на 400 км.

Черный журавль — таежный вид; в Якутии гнездится на болотах и марях среди редкостойных лиственничников и кустарников [16, 17]. Северное распространение черного журавля в прошлом, очевидно, свидетельствует о том, что во время каргинского интерстадиала (или термохрона), когда на севере Сибири происходило расширение ареала лесной растительности, этот вид находил подходящие места для обитания в низовьях р. Алдан.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование ГГБ выполнено в рамках проекта по госзаданию ИГАБМ СО РАН. Лабораторная работа НВЗ поддержана грантом РФФИ 20-04-00975.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Ю.А. Мочанову за передачу костного материала из стоянки Ихине-2 для исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИГАБМ СО РАН — Институт геологии алмаза и благородных металлов СО РАН, Якутск; ОА ИЯЛИ — отдел археологии Института языка, литературы и ис-

тории СО РАН, Якутск; ПИН — Палеонтологический институт им. А. А. Борисяка РАН, Москва.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Пантелеев А.В.* // Русск. орнитол. журн. 1999. Вып. 72. С. 3–17.
2. *Зеленков Н.В.* // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 9. С. 1077–1087.
3. *Зеленков Н.В.* // Казарка. 2008. Т. 11. Вып. 1. С. 13–21.
4. *Zelenkov N.V., Kurochkin E.N., Karhu A.A., Ballman P.* // *Oryctos*. 2008. V. 7. P. 213–222.
5. *Зеленков Н.В., Курочкин Е.Н.* // Палеонтол. журн. 2014. Вып. 6. С. 70–79.
6. *Савинецкий А.Б.* // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1995. Т. 100. Вып. 2. С. 33–39.
7. *Dussex N., Stanton D.W.G., Sigeman H., et al.* // *Commun. Biol.* 2020. V. 3: 84.
8. *Langeveld B., Streutker J., Prummel W.* // *Cranium*. 2017. V. 34. P. 74–91.
9. *Мочанов Ю.А.* Древнейшие этапы заселения человеком Северо-Восточной Азии. Новосибирск: Наука, 1977. 246 с.
10. *Kuzmin Y.V., Orlova L.A.* // *J. World Prehist.* 1998. V. 12. P. 1–53.
11. *Bacher A.* Vergleichend morphologische Untersuchungen an Einzelknochen des postkranialen Skeletts in Mitteleuropa vorkommender Schwäne und Gänse. München: Universität München, 1967. 109 s.
12. *Poland J.G.* A methodological approach to the identification of duck and goose remains from archaeological sites with an application to Roman Britain. Sheffield: Univ. Sheffield, 2018. 323 p.
13. *Field D.J., Lyner C., Brown C., et al.* // *PLoS ONE*. 2013. V. 8: e82000.
14. *Рябицев В.К.* Птицы Сибири: справочник-определитель в 2 т. М., Екатеринбург: Кабинетный ученый, 2014. Т. 2. 425 с.
15. *Дегтярев В.Г.* Водно-болотные птицы в условиях криоаридной равнины. Новосибирск: Наука, 2007. 292 с.
16. *Воробьев К.А.* Птицы Якутии. М.: Наука, 1963. 336 с.
17. *Андреев Б.Н.* // Тр. Окского гос. запов.-ка. 1976. Вып. 13. С. 123–129.

DYUKTAI GOOSE (*Anser djuktaiensis*) AND HOODED CRANE (*Grus monacha*) IN THE PLEISTOCENE OF CENTRAL YAKUTIA

N. V. Zelenkov^{a,#} and G. G. Boeskorov^b

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

^b Diamond and Precious Metals Geology Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS A.V. Lopatin

The paper reports the first study of bird bones from the Late Pleistocene (31–24 thousand years BP) Ikhine-2 locality (Central Yakutia), one of the key sites of the Upper Paleolithic in North-Eastern Siberia. This bird association is the northernmost and oldest for the Pleistocene of Eastern Siberia. Among the materials, the coracoids of the extinct Dyuktai goose (*Anser djuktaiensis*) and the hooded crane (*Grus monacha*) are of particular interest. The Dyuktai goose is a large representative of the mammoth fauna, originally described from younger deposits (12–13 thousand years BP) of southeastern Yakutia. This is the second finding of the species in Russia, significantly expanding the understanding of the geography and time of its distribution. The hooded crane is a rare modern species with a limited range, and it is here for the first time reported in the fossil record. This find indicates more northern distribution of this species during the Karginian interstadial. Bones of *Anas crecca* and *Larus canus* were also found at the site.

Keywords: fossil birds, extinct species, Late Pleistocene, Eastern Siberia

УДК 569.742.2; 591.69(470.5)“624/627”

ПЕРВАЯ НАХОДКА ЯИЦ НЕМАТОДЫ *BAYLISASCARIS TRANSFUGA* RUDOLPHI, 1819 (ASCARIDOIDEA, NEMATODA) В ПОЗДНЕМ ПЛЕЙСТОЦЕНЕ

© 2021 г. Т. Н. Сивкова¹, П. А. Косинцев^{2,*}

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 13.04.2021 г.

После доработки 16.04.2021 г.

Принято к публикации 17.04.2021 г.

Проведен палеопаразитологический анализ копролитов большого пещерного медведя (*Ursus kanivetz* Vereshchagin, 1973). Материал для исследований был получен в ходе раскопок в пещере Игнatieвская (Южный Урал, Россия; 54°53'N 57°46'E). Отложения с копролитами датируются серединой позднего плейстоцена (90 000–30 000 лет назад). В результате палеопаразитологического анализа установлено наличие в копролитах яиц характерной для представителей Ursidae нематоды — *Baylisascaris transfuga* Rudolphi, 1819. Яйца хорошо сохранились и не потеряли морфологических признаков. Большой пещерный медведь был инвазирован нематодой *B. transfuga*. Это первая находка нематоды *B. transfuga* плейстоценового возраста и первая находка паразитов в копролитах большого пещерного медведя.

Ключевые слова: палеопаразитология, большой пещерный медведь, *Ursus kanivetz*, копролиты, *Baylisascaris transfuga*, яйца, поздний плейстоцен, Урал

DOI: 10.31857/S2686738921040247

Изучение остатков паразитов из субфоссильных копролитов дает уникальную информацию для изучения истории формирования современных паразитоценозов и в целом, экопаразитарных систем. Эти данные позволяют реконструировать такие аспекты биологии и экологии вымерших видов, которые невозможно выполнить другими методами. Проведены палеопаразитологические исследования субфоссильных копролитов мамонта (*Mammuthus primigenius* Blumenbach, 1799) [1], гиены пахикрокуты (*Pachycrocuta brevirostris* Kretzoi, 1938) [2]. Палеопаразитологические исследования копролитов большого пещерного медведя (*Ursus (Spelaearctos) spelaeus* s. l.) до настоящего времени не проводились.

Целью исследования было палеопаразитологическое изучение субфоссильных копролитов большого пещерного медведя (*U. kanivetz* Veresh-

chagin, 1973) из отложений Игнatieвской пещеры на Южном Урале (54°53' N 57°46' E). Копролиты накопились от особей, погибших в пещере во время зимней спячки [3, 4].

В раскопе 1–2 было найдено большое количество копролитов большого пещерного медведя [3]. В слое 5, который состоит из суглинка [5], копролиты распределены дисперсно. Исследованы 3 образца копролитов из этого слоя с глубин: — 90–130 см, — 120–130 см, — 130–140 см.

В слое 5 найдено 2627 костей большого пещерного медведя, единичные кости зайца беляка (*Lepus timidus* L., 1758), степной пищухи (*Ochotona pusilla* Pallas, 1769), сурка (*Marmota bobak* Muller, 1776), серого хомячка (*Cricetulus migratorius* Pallas, 1773), степной пеструшки (*Lagurus lagurus* Pallas, 1773), копытного лемминга (*Dicrostonyx gulielmi* Sanford, 1869), сибирского лемминга (*Lemmus sibiricus* Kerr, 1792), узкочерепной полевки (*Microtus gregalis* Pallas, 1779), полевки-экономки (*M. oeconomus* Pallas, 1776), волка (*Canis lupus* L., 1758), песца (*Vulpes lagopus* L., 1758), лисицы (*V. vulpes* L., 1758), северного оленя (*Rangifer tarandus* L., 1758), первобытного бизона (*Bison priscus* Vojanus, 1827) [3]. Это типичные виды позднеплейстоценового мамонтового комплекса Южного Урала [6]. По

¹ Пермский государственный аграрно-технологический университет им. академика Д.Н. Прянишникова, Пермь, Россия

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

*e-mail: kpa@ipae.uran.ru

костям пещерного медведя из слоя 5 получена радиоуглеродная дата — более 27500 лет назад, ИЭМЭЖ-723 [3]. Все эти данные позволяют датировать слой 5 первой половиной — серединой позднего плейстоцена, т.е. 30000–90000 лет назад (морские изотопные стадии 4–3). Этим же периодом датируются изученные копролиты.

Обработка образцов проводилась по принятым протоколу [7] и методике [8]. Из каждого образца было подготовлено 70–100 стекол. Просмотр препаратов проводили на микроскопе Meiji при увеличении $\times 100$ и $\times 400$. Дифференцировали яйца паразитов по эталонным препаратам и описаниям в литературе [9].

В копролите с глубины –90–100 см обнаружены два яйца гельминтов, округло-овальной формы темно-коричневого цвета с плотной бугристой оболочкой. Размеры яиц составили в длину 81.18 мкм, в ширину –53.20 мкм. Данная морфология и размеры соответствуют описанию яиц *Baylisascaris transfuga* Rudolphi, 1819 — типичного паразита современных медведей [10]. Яйца нематоды *B. transfuga* имеют прочную оболочку, что позволило яйцам нематоды достаточно хорошо сохраниться в копролитах и сохранить видоспецифические морфологические признаки. При хорошей сохранности оболочек яиц их внутреннее содержимое не визуализировалось, что свидетельствует о разрушении эмбрионов.

Основным и окончательным хозяином *B. transfuga* являются все виды медведей [10]. Промежуточными хозяевами служат различные виды млекопитающих, включая грызунов и птиц [11]. Яйца *B. transfuga* выделяются с фекалиями медведей в окружающую среду, где созревают в течение нескольких недель. Они длительное время, до нескольких лет, сохраняют жизнеспособность [10]. В районах обитания медведей яйцами *B. transfuga* обсеменены растительность и, особенно, почва. Инвазированы ими и обитающие в районе грызуны [12].

Большой пещерный медведь (*U. kanivetz*) был растительноядным, преимущественно травоядным, видом [13]. Животная пища составляла небольшую долю в его рационе [13]. Поэтому основным путем заражения пещерных медведей могло быть заглатывание яиц вместе с травянистой растительностью. Другим, менее вероятным, путем могло быть употребление в пищу промежуточных хозяев, в частности грызунов. Одним из промежуточных хозяев является полевка-экономка (*M. oeconomus*) [12]. Этот вид обитал на Южном Урале в течение всего позднего плейстоцена [6] и его остатки найдены в одном слое с копролитами пещерного медведя [3].

В середине позднего плейстоцена на Южном Урале совместно обитало 3 вида медведей — большой пещерный медведь (*U. kanivetz*), малый пе-

щерный медведь (*U. ex gr. savini-rossicus*) и бурый медведь (*U. arctos* L., 1758) [6]. Их рацион питания включал в разных пропорциях как растительную (травянистую), так и животную пищу, в том числе грызунов [13]. Таким образом, в середине позднего плейстоцена основными и конечными хозяевами *B. transfuga* на Южном Урале были три вида медведей.

Это первая находка нематоды *B. transfuga* Rudolphi, 1819 плейстоценового возраста и первая находка паразитов в копролитах большого пещерного медведя.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, тема № АААА-А19-119031890086-0.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарим музей Института экологии растений и животных УрО РАН за предоставленные для анализа образцы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сердюк Н.В., Мащенко Е.Н. Обзор известных паразитов шерстистого мамонта (*MAMMUTHUS PRIMIGENIUS* (BLUMENBACH, 1799)) // Труды Зоологического института РАН. 2018. Т. 322. № 3. С. 306–314.
2. Angela R., Perri A.R., Heinrich S., et al. Earliest Evidence of *Toxocara* sp. in a 1.2-Million-Yr-Old Extinct Hyena (*Pachycrocuta brevirostris*) Coprolite from Northwest Pakistan // *The Journal of Parasitology*. 2017. V. 103. № 1. P. 138–141.
3. Смирнов Н.Г., Большаков В.Н., Косинцев П.А., и др. Историческая экология животных гор Южного Урала. Свердловск: УрО АН СССР; 1990.
4. Косинцев П.А., Воробьев А.А. Биология большого пещерного медведя (*Ursus spelaeus* Ros. et Hein.) на Урале. В кн.: Мамонт и его окружение: 200 лет изучения. М.: Геос; 2001. С. 266–278.
5. Smirnov N.G., Kosintsev P.A., Stefanovsky V.V. Karst caves of the Southern Urals: Quaternary deposits, paleoenvironment, dating and archaeological heritage of Ignatievskaya Cave. In: *The Quaternary of the Urals. Global trends and Pan-European Quaternary records: Fieldtrip Guide-book of the International INQUASEQS Conference* (Ekaterinburg, September 10–16, 2014). Ekaterinburg: IPAE UrB RAS; 2014. P. 42–49.
6. Kosintsev P.A., Bachura O.P. Late Pleistocene and Holocene mammal fauna of the Southern Urals // *Quaternary International*. 2013. V. 284. P. 161–170.
7. Wood J.R., Wilmshurst J.M. A protocol for subsampling Late Quaternary coprolites for multi-proxy Analysis // *Quaternary Science Reviews*. 2016. V. 138. P. 1–5.
8. Savinetsky A.B., Khrustalev A.V. Paleoparasitological investigations in Mongolia, Middle Asia and Russia // *International Journal of Paleopatology*. 2013. № 3. P. 176–181.

9. *Sprent J.F.A.* Notes on *Ascaris* and *Toxascaris*, with a definition of *Baylisascaris* gen. nov. // *Parasitology*. 1968. V. 58. P. 185–198.
10. *Sapp S.G.H., Gupta P., Martin M.K., et al.* Beyond the raccoon roundworm: the natural history of non-raccoon *Baylisascaris* species in the new world // *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2017. № 6. P. 85–99.
11. *Sheikh M.M., Tak H., Fazili M.F.* *Baylisascaris transfuga*: a parasite with zoonotic potential // *International Journal of Advanced Scientific Resesarch and Management*. 2018. V. 3. № 12. P. 174–180.
12. *Bugmyrin S.V., Spiridonov S.E.* First record of natural *Baylisascaris transfuga* (Ascaridoidea, Nematoda) infection in wild rodents // *Parasitology*. 2019. V. 146. P. 1714–1718.
13. *Naito Y., Meleg I., Robu M., et al.* Heavy reliance on plants for Romanian cave bears evidenced by amino acid nitrogen isotope analysis // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. P. 6612.

FIRST FINDING OF NEMATODE EGGS *Baylisascaris transfuga* RUDOLPHI, 1819 (ASCARIDOIDEA, NEMATODA) IN THE LATE PLEISTOCENE

T. N. Sivkova^a and P. A. Kosintsev^{b, #}

^a Perm State Agro-Technological University, Perm, Russian Federation

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

[#]e-mail: kpa@ipae.uran.ru

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

Paleoparasitological analysis of coprolites of the cave bear (*Ursus kanivetz* Vereshchagin, 1973) was carried out. The material for research was obtained during excavations in the Ignatievskaya cave (Southern Urals, Russia; 54°53'N 57°46'E). The deposits with coprolites date back to the middle of the Late Pleistocene (90 000–30 000 years ago). As a result of paleoparasitological analysis, the presence of eggs in the coprolites of the nematode characteristic of representatives of Ursidae – *Baylisascaris transfuga* Rudolphi, 1819. The eggs are well preserved and have not lost their morphological features. The large cave bear was infested by the nematode *B. transfuga*. This is the first finding of the nematode *B. transfuga* in Pleistocene-aged sediments and the first finding of parasites in coprolites of the cave bear.

Keywords: paleoparasitology, cave bear, *Ursus kanivetz*, coprolite, *Baylisascaris transfuga*, eggs, Late Pleistocene, Ural

УДК 593.12

АРОМОРФОЗЫ В ЭВОЛЮЦИИ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЭУКАРИОТ (НА ПРИМЕРЕ ФОРАМИНИФЕР – FORAMINIFERA D'ORBIGNY, 1826)

© 2021 г. В. И. Михалевич*

Представлено академиком РАН С.В. Рожновым

Поступило 10.07.2020 г.

После доработки 22.04.2021 г.

Принято к публикации 23.04.2021 г.

Ароморфозы одноклеточных организмов почти не исследованы. Фораминиферы дают уникальную возможность такого изучения, поскольку они сложно устроены и наиболее полно представлены в геологической летописи. В их развитии впервые выявлено более 10 ароморфозов, возникших в разных классах фораминифер независимо и параллельно. Из них ключевые: возникновение агглютинированной, а затем секреторной известковой раковины, бифонтиальной (bilamellar) стенки, многокамерности, дифференциации камер, интегрирующей системы каналов и ядерного дуализма. Они представляют своеобразные пути эволюции на одноклеточном уровне. Многокамерность можно сравнить с многоклеточностью, дифференциацию камер – с дифференциацией тканей, систему каналов, поразительную по сложности и разносящую O_2 – с кровеносной системой Metazoa.

Ключевые слова: ароморфозы, план строения, одноклеточные эукариоты, ядерный диморфизм

DOI: 10.31857/S2686738921040168

Закономерности эволюционного развития живых организмов были изучены, главным образом, на многоклеточных. Одноклеточные эукариоты такими исследованиями затронуты меньше. Фораминиферы (Ф) представляют уникальную группу для изучения эволюции одноклеточных, так как имеют необычайно сложный для одноклеточного уровня скелет, широко распространены в современных морях и наиболее полно представлены в геологической летописи.

Первые однокамерные безраковинные Ф¹ возникли в неопротерозе ~ 950–1350 млн лет назад [1]. Настоящая статья представляет попытку распространить понятие “ароморфоз” (А) как “**прогрессивное эволюционное** изменение строения, приводящее к общему повышению **уровня организации организмов**” [2] на одну из наиболее сложно

устроенных групп одноклеточных. В их развитии выявлены следующие А:

1. Приобретение безраковинными Ф сначала органической (со), а в кембрии – твердой агглютинированной (са) раковины (Р) (рис. 1), обеспечивающей защиту и лучшую выживаемость. В процессе эволюции Ф именно скелет, отражающий общий план строения их организма, претерпел наибольшие изменения.

2. Переход от однокамерных Р к многокамерности (М) – наиболее важный, ключевой ароморфоз (А) в развитии Ф. Он представляет особый путь эволюции – вариант полимеризации внутриклеточных компонентов в пределах одной клетки, сравнимый с полимеризацией клеток в организме. М возникла во всех классах Ф, кроме самого примитивного из них – *Astrorhizata* (рис. 1). У *Miliolata* и *Rotaliata* возникли супермногокамерные (СМ) Р, что привело к еще большему повышению сложности строения и появлению жизненной стратегии, сходной с многоклеточными (продолжительность жизни 4–6 лет, повторные циклы размножения у одной особи).

3. Следующий шаг – дифференциация камер сначала по форме, а затем и по функции (рис. 1): флотирующие, выводковые (ВК), зародышевые (ЗК) и слои камер разного строения (*Miliolata*,

¹ В данной статье Ф рассматриваются как тип, состоящий из пяти классов, представляющих самостоятельные филогенетические линии [3–5], что подтверждено данными молекулярных исследований [6].

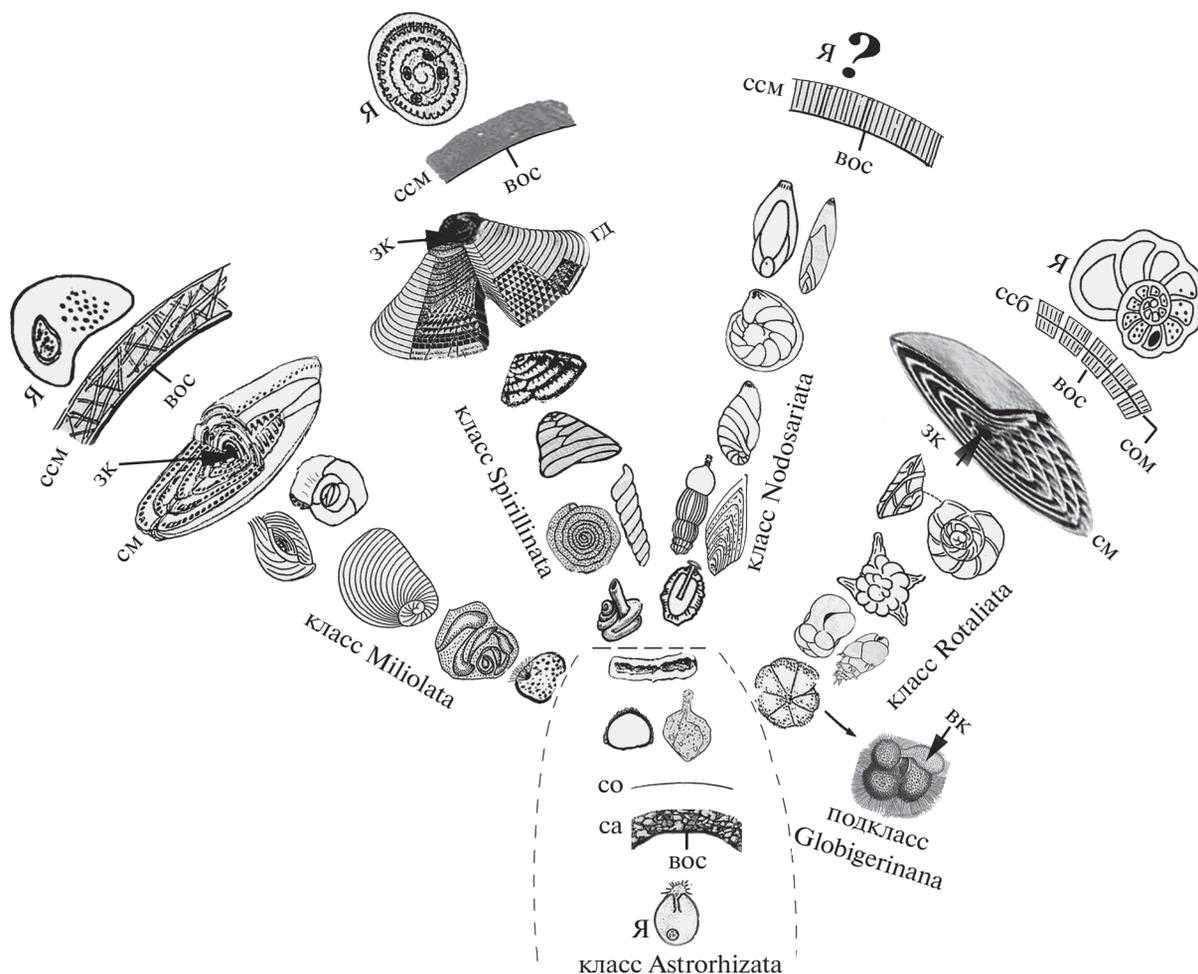


Рис. 1. Основные филогенетические линии (классы) Ф и особенности их строения.

Spirillinata, Rotaliata) у глубоко дифференцированных (ГД) Р, что сравнимо с дифференциацией клеток многоклеточных и образованием тканей. Возникновение М (рис. 1, 2) кардинально изменило план строения организма, привело к усложнению его структуры.

4. Тип строения Р определяет тип токов цитоплазмы (Ц) внутри организма (рис. 2а–л), обеспечивающий сообщение начальных камер с последующими и с внешней средой, способствуя активизации физиологических процессов. Этот путь наиболее длинный и сложный у клубковидных Р (рис. 2б, 2в), наиболее прямой – у одноосных (рис. 2а). Трохоидные Р (рис. 2е, 2ж) классов Spirillinata и Rotaliata более компактны и прочны, а открытая пупочная область создает наиболее короткий и прямой путь циркуляции Ц.

5. Влияет на токи Ц и положение устья (У). Оно конечное (рис. 2а–г, 2м, 2н) на начальных этапах эволюции во всех классах, кроме роталиат, где У имеет базальное положение (рис. 2о, 2п), что привело к глубокому изменению плана строе-

ния Р и токов Ц (рис. 2д–2ж). Даже при одинаковом спиральноплоскостном типе Р при базальном положении У этот путь короче (рис. 2г и 2д).

6. По мере возрастания числа камер и сложности их внутреннего строения, путь сообщения Ц отдельных камер через межкамерные форамены (ф) (рис. 3а) и всего организма с внешней средой через У становился недостаточным. Возникновение дополнительных проходов для токов Ц внутри камер (проходы – п (рис. 3б), туннели (т) (рис. 3в), столоны (с) (рис. 3г–3е)), часто между очень сложными внутренними элементами эндоскелета (э) (рис. 3д–3е) усложнило и диверсифицировало эти потоки, способствуя лучшей взаимосвязи отдельных частей организма и его связи с внешней средой.

7. В связи с усиленным током Ц в области У возникли опорные внутренние устьевые структуры (УС), имеющие своеобразное, часто довольно сложное строение в разных классах (рис. 4а–4г). Объединение этих внутренних УС от камеры к камере в единую интегрирующую УС (ИУС) при-



Рис. 2. Токи Ц при разных типах строения Р.

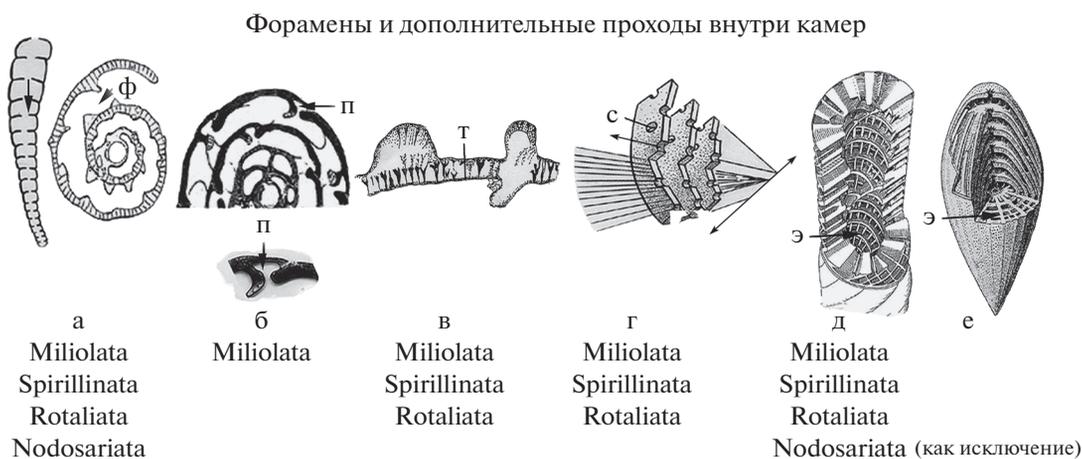


Рис. 3. Межкамерные форамены и дополнительные проходы внутри Р.

вело к значительной дифференциации и компартиментализации Ц (рис. 4д–4ж) и явилось следующей ступенью в развитии А у Ф.

8. Возникновение системы каналов (Ка) (рис. 4з–4к) – ключевой А, в результате которого в организме появляется новая функциональная интегрирующая система. Ка, в отличие от столбов и проходов, ограничены собственными стенками. Они отделяют циркулирующую в них обогащенную O_2 эктоплазму от эндоплазмы камер. По функции они сравнимы с кровеносной системой многоклеточных, что поразительно для одноклеточного уровня организации и не встречается ни в одной другой группе протистов. Наиболее сложные системы каналов развиты у роталиат [7], более примитивные – у спириллинат [5, 8, 9].

9. Возникновение параллельно во всех многокамерных классах известковой секреторной монофонтинальной стенки (ссм) со своеобразной

ультраструктурой в каждом из них (рис. 1) – один из ключевых А у Ф, так же как возникновение бифонтинальной стенки роталиат (ссб) – известь у них отлагается не по одну сторону над внутренним органическим слоем (вос), а сразу по обе стороны срединной органической мембраны (сом) – (рис. 1). Их стенка обеспечивает наибольшую прочность при наименьшей толщине и весе, обладает наибольшими конструктивными возможностями [5], что создало предпосылки возникновения следующего А (10) – приспособлений к жизни в пелагиали (подкласс Globigerinana) (рис. 1), отразившихся в появлении органелл, обеспечивающих плавучесть.

11. Изменения скелета шли параллельно изменениям живой клетки. Возникновение ядерного диморфизма у милиолят и роталиат (рис. 1) – ключевой А, обеспечивающий дальнейшее развитие. Не случайно именно в этих классах воз-

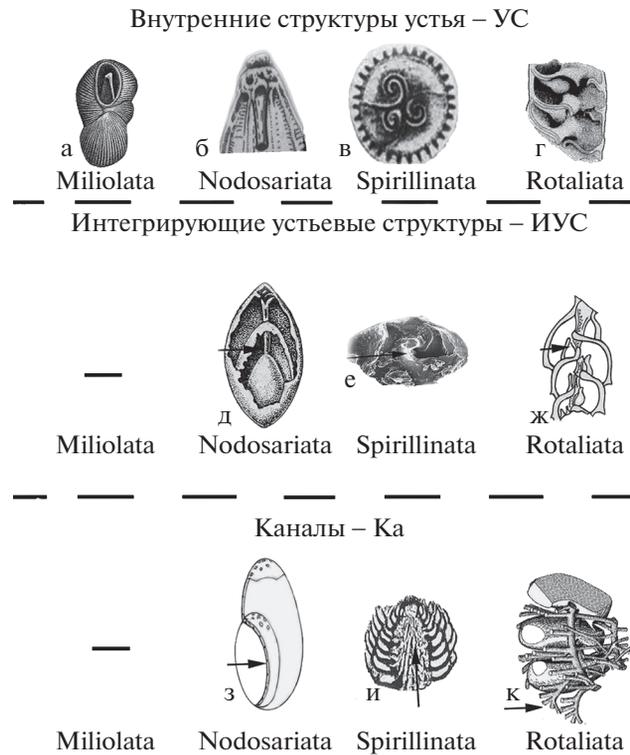


Рис. 4. Внутренние структуры У, ИУС и Ка.

никли крупные СМ формы с наиболее сложным строением скелета (рис. 1). Дифференциация ядер (Я) на соматические (крупные) и генеративные (мелкие) и, соответственно, ядерных функций сравнима с разделением этих функций в органах многоклеточных. Ядерный аппарат Ф отличается от всех других типов одноклеточных эукариот (в том числе и от инфузорий [4, 5]).

Наибольшее число А произошло в классе Rotaliata, что привело к резкому увеличению числа таксонов, ускорению темпов их эволюции, завоеванию новой экологической ниши – пелагиали [5]. Это самый молодой и высокоорганизованный класс Ф подобно млекопитающим среди позвоночных.

Рассмотренные выше А привели к глубокому изменению плана строения Ф, возрастанию их сложности, поразительной для одноклеточного уровня организации, повышению целостности организма, интенсификации функций и усилению конкурентоспособности, позволили наиболее продвинутым их группам перейти на новый уровень организации и обеспечили пути дальнейшей прогрессивной эволюции. Они происходили в разных классах Ф независимо и параллельно в разное время и имеют своеобразные черты в каждом из них [4]. В отличие от идиоадаптаций, они не связаны напрямую с влиянием окружающей среды. Их можно рассматривать как своеобраз-

ный путь эволюции и попытку преодолеть ограничения одноклеточного уровня за счет паразитического увеличения сложности организации. Переход на новый, многоклеточный уровень смог осуществиться при возникновении определенных условий, когда возможности одноклеточного уровня организации оказались исчерпанными.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены за счет средств госзадания АААА-А19-119020690109-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Groussin M., Pawlowski J., Yang Z. Bayesian relaxed clock estimation of divergent time in Foraminifera // Molecular phylogenetic and evolution. 2011. № 61. P. 157–166.
2. Северцов А.Н. Морфологические закономерности эволюции. М.–Л: АН СССР, 1939. 610 с.
3. Михалевиц В.И. Макросистема фораминифер // Известия РАН: Серия биол., 1998. № 2. С. 266–271.
4. Михалевиц В.И. Основы зоологии. Protista. Фораминиферы. Петербург: Наука, 2000. С. 525–637.
5. Mikhalevich V.I. Post-Cambrian Testate Foraminifera as a System in its Evolution. New York: Nova Science Publishers, 2013. 444 p.

6. *Pawlowski J., Holzmann M., Tyszka J.* New supraordinal classification of Foraminifera: Molecules meet morphology // *Marine micropaleontology*. 2013. № 100. P. 1–10.
7. *Hottinger L.* Comparative anatomy in selected larger Foraminifera. In: *Hedley R.H., Adams C.G.* (Eds). *Foraminifera*. London, 1978. P. 203–206.
8. *Rigaud S., Blau J., Martini R., Rettori R.* Taxonomy and phylogeny of Trocholinidae (Involutinina) // *Journ. Foraminiferal. Reseach*. 2013. V. 43. № 4. P. 317–339.
9. *Schlagintweit F., Rigaud S., Wilmsen M.* Cenomanian trocholinids of northern Cantabria // *Facies*, 2015. № 61. P. 12–27.

AROMORPHOSES IN EVOLUTION OF UNICELLULAR EUKARYOTES (WITH THE EXAMPLE OF FORAMINIFERA D'ORBIGNY, 1826)

V. I. Mikhalevich^{a, #}

^a *Zoological Institute Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: mikha07@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS S.V. Rozhnov

Aromorphoses of unicellular organisms are almost unexplored. Foraminifera give a unique opportunity of such studies, having the most complex structure and being most fully represented in the geological record. For the first time, in their development, more than 10 aromorphoses (key advances) were revealed, which arose in different classes of foraminifera independently and in parallel. Of these, the key ones are: the emergence of an agglutinated and then secreted calcareous shell, a bifontinal (bilamellar) wall, multichamberedness, differentiation of chambers, an integrating system of channels and nuclear dualism. They represent peculiar ways of evolution at the unicellular level. Multicamereness can be compared with multicellularity, differentiation of chambers – with differentiation of tissues, a system of channels, striking in its complexity and carrying O₂ – with the Metazoa circulatory system.

Keywords: aromorphoses, plan of structure, unicellular eukaryotes, nuclear dimorphism

УДК 633.81:57.085.23:575

РЕГЕНЕРАЦИЯ *in vitro* И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ БЛИЗОСТЬ РАСТЕНИЙ *Hyssopus officinalis* L.

© 2021 г. И. В. Булавин^{1,*}, Н. Н. Иванова¹, член-корреспондент РАН И. В. Митрофанова¹

Поступило 14.04.2021 г.

После доработки 23.04.2021 г.

Принято к публикации 23.04.2021 г.

Биотехнологические методы являются важным компонентом исследования генетических ресурсов растений и позволяют сохранять как редкие природные экземпляры, так и полезные селекционные генотипы, в том числе эфиромасличных растений, используемых в медицине, парфюмерии, кулинарии и т.д. Для клонального микроразмножения *in vitro* ключевым моментом является сохранение генетической стабильности материала. Считается, что регенерация растений *in vitro* из меристем или вегетативных почек дает идентичные клоны, при этом обсуждается влияние регуляторов роста в составе питательной среды на генетическую стабильность введенного в культуру *in vitro* растительного материала. В связи с этим целью нашей работы являлось определение генетической близости между растениями, культивируемыми *ex situ* и *in vitro*. В качестве исходного материала использовали растения *Hyssopus officinalis* L. сорта Никитский Белый (селекция НБС). Регенерацию из сегментов побега с узлом осуществляли на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной 6-бензиламинопурином (БАП) в концентрациях 0.3–0.9 мг/л и 0.1 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК). Установлено, что внесение 0.5 мг/л БАП являлось достаточным для формирования и развития морфологически нормальных органов. Генетический анализ на основе RAPD и ISSR-метода показал полное генетическое сходство между исследованными растениями *ex situ* и *in vitro*.

Ключевые слова: *Hyssopus officinalis* L., растения *ex situ*, регенерация *in vitro*, RAPD, ISSR, генетическая близость

DOI: 10.31857/S2686738921040065

Hyssopus L. – род многолетних трав или полукустарников [1], включающий, согласно “The Plant List” 7 видов и 3 подвида [2], которые естественным образом распространены в Южной Европе, Центральной Азии и Северной Африке [3]. В коллекциях *ex situ* иссоп (*Hyssopus officinalis* L.) в основном широко используется как ароматическое растение. Кроме того, благодаря ветрогонному, месячногонному, стимулирующему, дигестивному и тонизирующему действию растения иссопа используются в медицине. Компоненты, которые способствуют его целебным свойствам, включают: эфирное масло, состоящее в основном из пинокамфона, изопинокамфона, пиненов, камфена и терпенина; гликозид иссопин, дубильные вещества, флавоноиды, изолиновою кислоту, олеоноловую кислоту, маррубин, а также смо-

лу и камедь [4]. Иссоп является декоративным компонентом и, имея длительный период цветения и разнообразие окраски лепестков, применяется в ландшафтном дизайне [5, 6].

Традиционно иссоп размножают семенами [7], однако этот способ имеет некоторые ограничения для перспективных форм и сортов [8]. Увеличение количества клонов путем вегетативного размножения ограничивается слабым развитием корневой системы и высокой травматичностью полукустарников при разделении [9]. Размножение зелеными черенками, в зависимости от генотипа, также имеет определенные трудности при укоренении. Но данный тип размножения важен для сохранения продуктивных форм и сортов, а также для интенсификации производства необходимого количества посадочного материала. Биотехнологические методы в настоящее время позволяют массово размножить, изучить и сохранить полученные ценные единичные селекционные формы [10]. В Никитском ботаническом саду разработан эффективный метод регенерации *in vitro* растений иссопа и его форм из вегетативных органов и тканей, исключаящий этап каллусоге-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН”, Ялта, Россия

*e-mail: labgennbs@yandex.ru

неза [11]. Считается, что размножение растений *in vitro* указанным выше способом позволяет получить регенеранты, которые генетически идентичны материнским растениям [12]. Однако, согласно литературным данным, использование определенных концентраций регуляторов роста в питательной среде может привести к возникновению мутаций и генетической нестабильности [13]. Следовательно, для размножаемого ценного посадочного материала *in vitro* очень полезна оценка генетической близости [14].

Для исследования были взяты растения *Hyssopus officinalis* L. (сорт Никитский Белый), культивируемые *ex situ* на коллекционном участке Никитского ботанического сада. В качестве эксплантов использовали сегменты побега с узлом, которые стерилизовали последовательно в 70%-ном растворе этанола (1 мин), 1%-ном растворе тимеросала (10 мин), 0.3% растворе препарата “Дез ТАБ” (15 мин) и переносили на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [15], содержащую половинный набор макро-, и микросолей, полный состав витаминов, 30 г/л сахарозы, 9.0 г/л агара, 0.5–1.0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0.1 мг/л β -индолилмасляной кислоты (ИМК). Контрольной была среда МС без регуляторов роста. Последующие субкультивирования проводили на питательной среде МС того же состава с 0.3–0.9 мг/л БАП. Питательные среды автоклавировали в паровом стерилизаторе LAC 5060S (Daihan Labtech, Южная Корея) при 120°C в течение 10 мин. Регуляторы роста, витамины пропускали через шприцевой фильтр (TRP, Switzerland) с диаметром пор 0.22 мкм и добавляли в питательные среды после автоклавирования. Субкультивирование на свежие питательные среды проводили каждые 3 нед. Экспланты в культуральных сосудах содержали в фитокапсуле Уникальной научной установки “ФИТОБИОГЕН” ФГБУН “НБС-ННЦ” или климатической камере MLR-352-PE (Panasonic, Япония) при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения $37.5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ под холодным белым светом люминесцентных ламп (Philips TL, Япония). Весь срок культивирования *in vitro* составил 6 мес.

ДНК выделяли из листьев 5 побегов растений *ex situ* и адвентивных микропобегов *in vitro* на образцах с применением одного из классических способов с цетилтриметиламмоний бромидом ($2 \times$ ЦТАБ) [16] и 2%-м поливинилпирролидоном (ПВП). ПЦР проводили с использованием праймеров OPA1 5'-CAGGCCCTTC-3', OPA2 5'-TGC-CGAGCTG-3', OPA3 5'-AGTCAGCCAC-3', OPA4 5'-AATCGGGCTG-3' (RAPD-анализ) и UBC807 5'-(AG)₈T-3', UBC818 5'-(CA)₈G-3', UBC836 5'-(AG)₈YA-3', GR215 5'-(CA)₆GT-3', HB12 5'-(CAC)₃GC-3', X10 5'-AGC(ACG)₅C-3' (ISSR-ана-

лиз) в термоциклере C1000™ (Bio-Rad, Сингапур). Условия реакции были следующими: начальная денатурация – 95°C – 5 мин, денатурация – 95°C – 15 с, отжиг – 36 и 45°C (RAPD и ISSR-анализ) – 20 с, элонгация – 72°C – 1 мин, итоговая элонгация – 72°C – 10 мин (40 и 45 циклов соответственно). В качестве молекулярного маркера использовали Step 100 Long (Биолаб-микс, РФ). Амплифицированные фрагменты анализировали при помощи горизонтального электрофореза в 1.7% агарозном геле с буфером 0.5 \times TBE при 85 В в течение 1 ч с использованием универсального источника питания PowerPac™ (BioRad, Сингапур). Гель визуализировали с помощью системы документации E-box (Vilber Lourmat, Франция) и обрабатывали в программном обеспечении Image Lab™ версии 6.0 (BioRad, США). Эксперимент повторяли дважды, анализировали воспроизводимые полосы. Данные обрабатывали статистически с применением программного обеспечения Past [17].

Индукционными факторами развития эксплантов при культивировании *in vitro* являются тип и концентрация регуляторов роста в питательной среде [18]. Инициацию развития вегетативных почек иссопа *in vitro* на среде МС, дополненной 0.5–1.0 мг/л БАП и 0.1 мг/л ИМК, наблюдали на 8–10-е сутки культивирования (рис. 1).

Через 15 сут отмечали образование первых листьев. Через 21 сут культивирования формировался микропобег, в листовых пазухах которого закладывались аксиллярные почки. Наличие в среде БАП способствовало их развитию и образованию микропобегов второго порядка, которые отделяли и субкультивировали на среде МС, дополненной 0.3–0.9 мг/л БАП. Для оценки регенерационного потенциала микропобегов иссопа в культуре *in vitro* было проанализировано их число на эксплант (рис. 2).

Оптимальная концентрация БАП установлена на уровне 0.5 мг/л, при этом получено 3.3 ± 0.16 нормально сформированных микропобегов на эксплант. Присутствие в среде 0.7–0.9 мг/л БАП способствовало увеличению количества микропобегов до 4.5 ± 0.18 штук, при этом среди нормально сформированных органов и их структурных частей отмечали наличие различных морфологических изменений, таких как деформация, утолщение, срастание микропобегов, образование единичных непропорциональных листьев. Наличие в среде 0.3–0.4 мг/л БАП способствовало росту и удлинению микропобегов, их спонтанному укоренению, однако отмечали снижение интенсивности побегообразования.

Исследование генетической близости проводили между растениями, культивируемыми *ex situ* и регенерантами *in vitro*. Для скрининга использо-

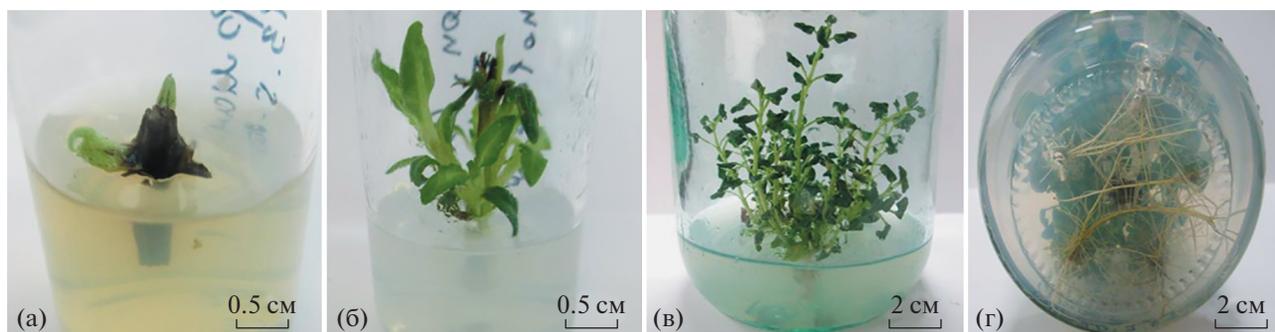


Рис. 1. Этапы регенерации *in vitro* иссопа из сегментов узла на модифицированной среде МС, дополненной БАП: а – инициация развития микропобега на первичном экспланте; б – формирование микропобегов; в – множественное образование микропобегов; г – спонтанный ризогенез.

вали 4 праймера RAPD и 6 праймеров ISSR (рис. 3).

Все исследованные праймеры давали воспроизводимые полосы. Количество последних для RAPD и ISSR-маркеров варьировало от 6 (ОРА3) до 10 (ОРА1) и от 2 (UBC807) до 8 (GR215) соответственно. RAPD праймеры образовывали ампликоны в диапазоне от 260 пн (ОРА2) до 3000 и более пн (ОРА2), при этом длина продуктов амплификации в ISSR-PCR была меньше и варьировала в пределах от 250 по (НВ12) до 1750 по (Х10). Наши результаты показали, что праймеры продуцировали ампликоны, которые были мноморфными для всех исследованных растений *ex situ* и *in vitro*, полиморфизм между ними не обнаружен.

Процессы, протекающие при культивировании тканей *in vitro*, во многом регулируются компонентами питательной среды, их концентрацией и соотношением, а также другими механическими, физическими и химическими факторами [19, 20]. Регуляция процесса морфогенеза *in vitro* с помощью цитокининов и ауксинов лежит в основе клонального микроразмножения растений [18, 19]. На этапе множественного побегообразования необходимо стимулировать активно протекающие процессы дифференцировки вновь образуемых морфогенных структур. Чаще всего для этих целей используют питательные среды одного состава, изменяя концентрацию регуляторов роста. Наши результаты показали, что культивирование *in vitro* эксплантов иссопа на среде МС с добавлением 0.5 мг/л БАП способствовало формированию побегов без визуальных морфологических изменений, а также спонтанному укоренению, что исключало отдельный этап ризогенеза. Увеличение концентрации БАП наряду с ростом числа микропобегов способствовало появлению аномалий у органов растений, что может быть вызвано составом питательной среды, и ее влиянием на гистологию и анатомию образованных структур. Это вполне согласуется с данными литературы [4].

Сходство регенерантов, полученных *in vitro*, в первую очередь оценивается по морфологическим и анатомическим признакам, однако важнейшим является их генетический анализ. Наши исследования подтвердили, что клоны иссопа, полученные из пазушных почек, были идентичны материнским растениям, что согласуется с литературой [14], и свидетельствует об определенной генетической стабильности данного материала при субкультивировании *in vitro* на питательных средах с регуляторами роста.

Таким образом, полученные результаты четко показали, что регенерация *in vitro* *H. officinalis* сорта Никитский Белый из сегментов побега с узлом на модифицированной среде МС с добавлением 0.5 мг/л БАП и 0.1 мг/л ИМК позволила получить регенеранты/клоны с нормальной морфологией, генетически идентичные материнским растениям *ex situ*, что очень важно для разработки

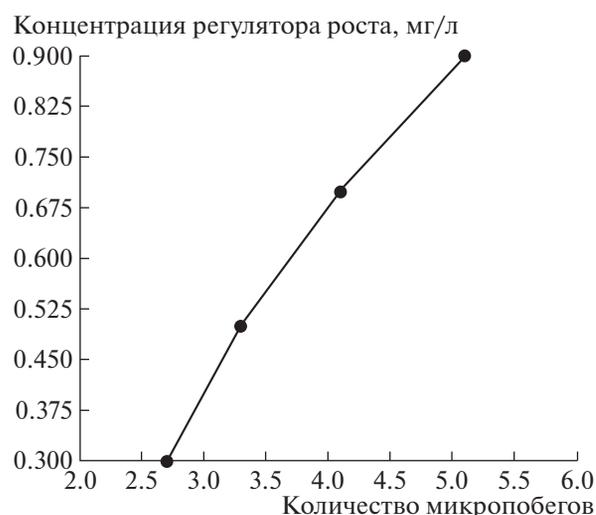


Рис. 2. Влияние различных концентраций БАП в питательной среде МС на регенерацию микропобегов *Hyssopus officinalis* сорта Никитский Белый *in vitro*.

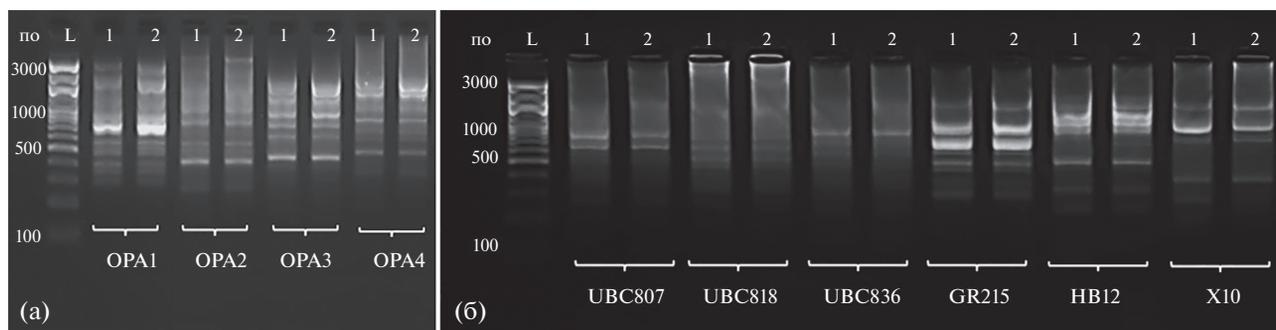


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами RAPD (а), ISSR (б) и ДНК, выделенной из листьев растений *Hyssopus officinalis* сорта Никитский Белый, культивируемых *ex situ* (1) и *in vitro* (2). М – маркер, по – пары оснований.

биотехнологических приемов массового тиражирования ценных генотипов, сортов и селекционных форм растений.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность заведующей Лабораторией ароматических и лекарственных растений ФГБУН “НБС-ННЦ”, главному научному сотруднику, д.б.н., О.М. Шевчук и научному сотруднику С.А. Феськову за предоставленный растительный материал *H. officinalis* сорта Никитский Белый *ex situ*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены в рамках Государственного задания № 0829-2019-0038 ФГБУН “НБС-ННЦ” на базе Уникальной научной установки “Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений” (УНУ “ФИТОБИОГЕН”).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mutu A., Clapco S., Martea R., et al. // Analele Științifice ale Universității “Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară. 2014. V. 15. P. 1–8.
- The Plant List. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Hyssopus>
- Ablizl P., Cong Y., Musa M., et al. // Chemistry of Natural Compounds. 2009. V. 45. № 3. P. 445.
- Toma I., Toma C., Ghiorghita G. // Acta Bot. Croat. 2004. V. 63. № 1. P. 59–68.
- Калиниченко Л.В. // Цветоводство. 2012. № 6. С. 2–3.
- Чернявских В.И. // Таврический вестник аграрной науки. 2018. Вып. 3. № 15. С. 137–146.
- Nanova Z., Slavova Y., Nenkova D., et al. // Bulg. J. Agric. Sci. 2007. V. 13. P. 213–219.
- Калиниченко Л.В., Маланкина Е.Л., Пржевальский Н.М., и др. // Картофель и овощи. 2013. № 8. С. 18–19.
- Беспалько Л.В., Харченко В.А., Шевченко Ю.П., и др. // Овощи России. 2016. Т. 2. № 31. P. 60–63.
- Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Grebennikova O.A., et al. // Acta Horticulturae. 2018. V. 1224. P. 101–107.
- Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Митрофанова О.В. Способ регенерации микропобегов *Hyssopus officinalis* L. в условиях *in vitro*. Патент РФ на изобретение № 0002529837. 27.09.2014. Бюл. № 27. Режим доступа: <https://edrid.ru/rid/216.012.fa00.html>.
- Pugliesi C., Cecconi F., Mandolfo A., et al. // Plant Breeding. 1991. V. 106. № 2. P. 114–121.
- Al-Qurainy F., Nadeem M., Khan S. // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. № 1. P. 111–116.
- Tiwari J.K., Chandel P., Gupta S., et al. // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2013. V. 19. № 4. P. 587–595.
- Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
- Супрун И.И., Токмаков С.В., Степанов И.В., и др. // Научные Труды СКФНЦСВВ. 2019. Т. 23. С. 31–39.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. // Palaeontol. Electron. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
- Бутенко П.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964.
- Bhojwani S.S., Dantu P.K. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. – New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2013.
- Bulavin I.V., Brailko V.A., Zhdanova I.V. // BIO Web of Conferences. 2020. V. 24. 00017.

***In vitro* REGENERATION OF *Hyssopus officinalis* L.
AND PLANT GENETIC SIMILARITY****I. V. Bulavin^{a, #}, N. N. Ivanova^a, and Corresponding Member of the RAS I. V. Mitrofanova^a**^a *Federal State Funded Institution of Science "The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS", Yalta, Russian Federation*[#] *e-mail: labgennbs@yandex.ru*

Biotechnological methods are an essential component of plant genetic resources investigation that allow both to preserve a rare natural plant and useful selection genotypes, especially essential oil bearing plants used in medicine, perfume, food etc. In the clonal micropropagation *in vitro*, the key moment is to retain genetic stability of *in vitro* material. It is considered that plant regeneration *in vitro* from meristem or vegetative buds gives identical clones, but the effect of the medium growth regulators on the genetic stability of *in vitro* plant material is discussed. Therefore, the objective of our work was to evaluate the genetic similarity of *ex situ* and *in vitro* plants. Investigation was performed on *Hyssopus officinalis* L. cv. Nikitskiy Belyi (NBG selection). Regeneration from the shoot single-node segments on the modified Murashige and Skoog culture medium (MS) supplemented with 6-Benzylaminopurine (BAP) in concentration 0.3–0.9 mg/L and 0.1 mg/L Indole-3-butyric acid (IBA) was carried out. It was established, that application of 0.5 mg/L BAP was sufficient for the organ formation and development without morphological deviations. Genetic analysis based on RAPD and ISSR-PCR had shown full genetic similarity of the investigated *ex situ* and *in vitro* plants.

Keywords: Hyssopus officinalis L., *ex situ* plants, *in vitro* regeneration, RAPD, ISSR, genetic similarity

УДК 599:575:591:513.5

СЕЛЕКЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ НА УСПЕШНОСТЬ КОГНИТИВНОГО ТЕСТА И НА НЕСПОСОБНОСТЬ К ЕГО РЕШЕНИЮ

© 2021 г. О. В. Перепелкина^{1,*}, И. И. Полетаева¹

Представлено академиком РАН К.В. Анохиным

Поступило 17.03.2021 г.

После доработки 27.03.2021 г.

Принято к публикации 27.03.2021 г.

На основе линии мышей ЭКС, исходно селектированной на способность к экстраполяции, было получено 3 поколения мышей, селектированных на успешное решение теста на неисчезаемость (“плюс”-сублиния) и на отсутствие такого решения (“минус”-сублиния). Успешность решения теста, требующая не только оперирования правилом неисчезаемости по Ж. Пиаже, но и выполнения сложного действия (исполнительная функция) было достоверно выше у плюс-сублинии, что является уникальным примером успешной селекции на когнитивный признак.

Ключевые слова: элементарная логическая задача, селекционный эксперимент, тест на поиск входа в укрытие, правило неисчезаемости, лабораторные мыши

DOI: 10.31857/S268673892104017X

В современной литературе существует большое число экспериментальных данных о роли генотипа в формировании когнитивных способностей животных [1–3]. Однако почти всегда речь при этом идет о различиях в выполнении когнитивных тестов за счет модуляции функции конкретных генов, определяющих отдельные свойства нейронных сетей (напр., [4–6] и др.). Отметим также, что в большей части таких работ термин “когнитивное” поведение подразумевает широкий спектр пластических функций, опирающихся главным образом на разные формы ассоциативного обучения [7, 8]. В настоящей работе в развитие представлений Л.В. Крушинского под когнитивными способностями животных понимается их способность улавливать закономерности, связывающие предметы и явления окружающего мира и строить на этой основе свое дальнейшее поведение [9]. Для анализа нейробиологических основ подобных когнитивных способностей и оценки взаимосвязи признаков поведения, в которых такие способности проявляются, требуется

создание адекватных генетических моделей, в частности, линий животных, которые различались бы по данным когнитивным способностям. В статье представлены принципиально новые данные по первым поколениям искусственного отбора на высокие и низкие показатели решения когнитивного теста, выявляющего такого рода когнитивную способность у лабораторных мышей. Данный селекционный эксперимент был основан на разной успешности выполнения мышами теста на поиск входа в укрытие (ПВУ), построенного на стремлении животного спрятаться в темноте от яркого света. Эта задача (в англоязычной литературе – puzzle-box test) представляет собой тест на когнитивную способность *per se*, поскольку ее решение – это решение элементарной логической задачи, не требующее предварительного научения. В представленных экспериментах тест состоял из 4 предъявлений задачи (проб теста) нарастающей сложности. Исходный вариант теста был впервые предложен как часть батареи тестов для оценки у мышей фактора g. Фактор g, или фактор общего интеллекта, был введен в экспериментальную психологию Ч. Спирменом, который показал, что результаты ряда тестов на познавательные способности человека коррелируют между собой. В настоящее время в экспериментах на животных фактор g рассматривают

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

*e-mail: ingapoletaeva@mail.ru

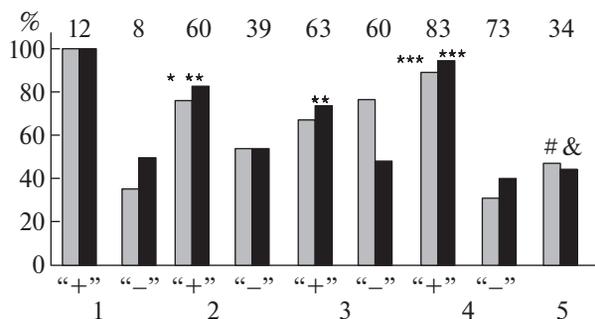


Рис. 1. Доля (в %, ось ординат) успешных решений теста на поиск входа в укрытие мышами F20 линии ЭКС (родители F1) (1), F1–F3 новых сублиний (“plus” и “minus” группы – 2–4), и мышами неселектированной контрольной популяции F23 (5) в предъявлении теста, когда лаз в темное отделение камеры был закрыт пробкой. Серые столбики – 1-е предъявление теста с пробкой, черные – 2-е. *, **, *** – значимо отличается от такой же доли в “минус” сублинии того же поколения при $p < 0.05, 0.01$ и 0.001 , соответственно (метод ф оценки различий альтернативных долей по Фишеру). #, & – отличия долей мышей, решивших эти пробы теста, от показателей “+” групп F1–F3 (с разными уровнями значимости, детали не представлены). Цифры над столбиками – число тестированных мышей каждой группы.

как интегральный показатель когнитивных способностей, вычисляемый на основе статистической обработки данных большой батареи тестов [10]. Логическая структура теста ПВУ основана на наличии у животного способности к улавливанию правила “неисчезаемости” в трактовке Ж. Пиаже [11]. Мышь, помещенная в ярко освещенную часть экспериментальной камеры ($30 \times 28 \times 27.5$ см), стремится спрятаться в ее темной части ($14 \times 28 \times 27.5$ см), куда ведет углубленный в пол узкий лаз. В первой пробе лаз в темную часть камеры открыт, и животное может туда перейти без препятствий. Во второй пробе лаз в темную часть камеры маскируют чистой стружкой, насыпая ее вровень с полом, а в 3-й и 4-й пробах (которые наиболее трудны для решения) лаз блокируют легкой пробкой из пластика и картона, которую мышь может отодвинуть или вынуть зубами из углубленного лаза [11]. На решение 1-й и 2-й проб животному дается 180 с, на решение 3-й и 4-й проб – 240 с. После перехода в темную часть камеры мышь оставляют в ней на 15–20 с, после чего отсаживают в отдельную клетку, и через 45–60 с предъявляют следующую пробу. Регистрировали латентный период (ЛП) перехода мыши в темный отсек (а также факт решения или нерешения данного этапа теста). В случаях с лазом, закрытым пробкой, регистрировали у животного наличие или отсутствие у животного движений “манипулирования” пробкой, т.е. попыток проникнуть в темноту – захват пробки зубами, ее приподнимание. В случае отсутствия решения этого этапа теста в течение 240 с наличие или отсутствие такого манипулирования было важным для оценки поведения признаком (см. ниже).

Критериями отбора для “плюс” сублинии было успешное решение теста в его наиболее “трудном” варианте, когда лаз был закрыт пробкой (см. ниже), а для “минус” сублинии – отсутствие

такого решения. В качестве исходной популяции для отбора были использованы мыши 20-го поколения селекции линии ЭКС [11]. Линия мышей ЭКС была получена в ходе проводившегося селекционного эксперимента на высокую способность к решению теста на экстраполяцию направления движения стимула, исчезнувшего из поля зрения. В первых поколениях этого эксперимента в селектируемой линии ЭКС было отмечено превышение доли правильных решений теста на экстраполяцию над случайным 50% уровнем [11], которое в последующих поколениях (с F9–10) стало обнаруживаться нерегулярно. В настоящей работе описаны результаты теста ПВУ, полученные у нескольких групп животных – у мышей ЭКС F20, составивших пары для получения потомства F1 данного селекционного эксперимента ($n = 20$), у мышей F1–F3 (сублинии “плюс” и “минус”, $n = 378$), а также у мышей контрольной неселектированной популяции КоЭКС ($n = 34$) (которая служила группой сравнения в селекции на высокие показатели решения теста на экстраполяцию [11]).

Выполнение теста ПВУ в первых двух пробах (лаз открыт и лаз замаскирован стружкой) было практически одинаковым у мышей групп “плюс” и “минус” и достаточно быстрым – на рис. 2 приведены средние ЛП решения этих проб. Различия между “плюс” и “минус” группами мышей этих поколений четко обнаруживались в пробах, когда лаз был закрыт пробкой, т.е. в 3-м и 4-м его предъявлениях (рис. 1 и 2), что может быть ответом на отбор в этих поколениях. За исключением мышей “+” в F2, показатели решения теста в 4-й пробе (т.е. доля мышей, решивших тест) были выше, а средние величины ЛП – короче, чем в 3-й пробе, что свидетельствует об использовании животными памяти о предыдущем решении.

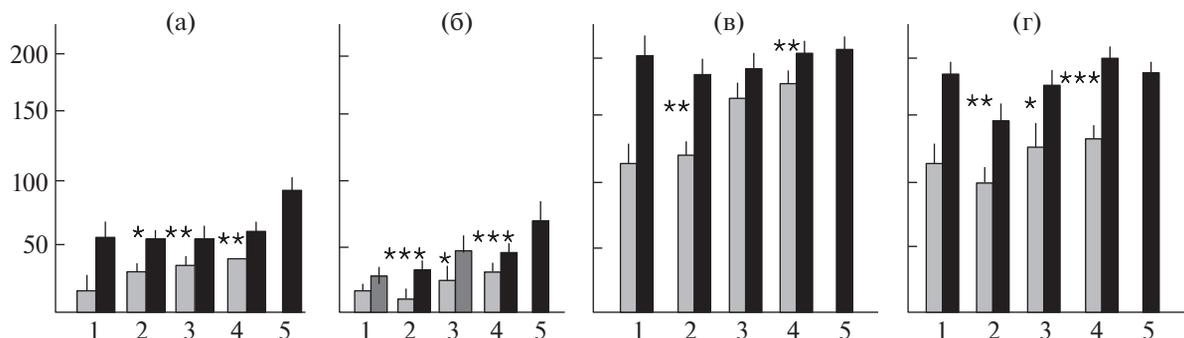


Рис. 2. Средние (\pm ошибка средней арифм.) ЛП перехода мышей в темноту при решении последовательных проб теста (на поиск входа в укрытие) у мышей разных групп (см. рис. 1). а – лаз открыт, б – лаз замаскирован стружкой, в и г – лаз закрыт пробкой. Серые столбики – мыши сублинии “плюс”, черные – мыши сублинии “минус”. 1–5 – как на рис. 1. *, **, *** – статистически значимо отличается от соответствующей величины в “минус” сублинии того же поколения при $p < 0.05, 0.01$ и 0.001 соответственно (однофакторный ANOVA с post hoc тестом по Фишеру).

Решение теста ПВУ мышами КоЭКС в 3-й и 4-й пробах теста, когда “лаз” в темное отделение камеры закрыт пробкой, было значительно менее успешным, чем у мышей трех селекционных поколений (в F2 и F3, в том числе и для сублинии “минус”).

Наблюдения за поведением мышей в случаях, когда лаз был замаскирован пробкой, а решения теста не произошло, показали, что в большинстве случаев животные стараются зацепить зубами или толкнуть пробку, т.е. обнаруживают “манипулирование” этим объектом, что наблюдалось и у мышей F20, и у животных селектированных сублиний. Это поведение можно рассматривать как свидетельство того, что мышь пытается пройти через лаз, но не может преодолеть препятствие. Мышей, которые не “манипулировали” пробкой, было очень мало – в F3 в сублинии “плюс” было одно такое животное из 83, в сублинии “минус” – два из 73. В то же время среди контрольных мышей КоЭКС (тестируемых в те же сроки, что и мышей F3), “не манипулировавших” пробкой животных было 8 из 34. Различия в успешности решения “трудных” этапов теста ПВУ, наиболее четко выраженные в последнем из тестируемых поколений, в F3, могут служить свидетельством позитивной роли отбора по этим контрастным признакам. Следует напомнить, что обе сублинии происходили из линии ЭКС, которая в течение 20 поколений формировалась из потомства животных, успешно решивших когнитивный тест на экстраполяцию направления движения [11]. Логическая структура теста на экстраполяцию предполагает, что для его успешного решения животное должно понимать, что исчезающий из поля зрения объект (поилка с молоком) продолжает существовать, и его можно искать. Таким образом, мыши обеих новых сублиний обладали в определенной степени пониманием принципа

неисчезаемости, что и проявилось в том, что подавляющее большинство мышей пытались проникнуть в лаз, толкая и приподнимая пробку (т.е. “манипулируя” ею). Селекция на успешное и не успешное решение теста ПВУ в его варианте с пробкой выявила, таким образом, различия не в когнитивных способностях, как таковых, а в способности добиться конкретного решения, т.е. в проявлении так называемых “исполнительных функций” (executive function) у этих животных [12, 13]. Успешность выполнения теста, т.е. проявление “исполнительных функций” у мышей разного генотипа была показана в одной из первых работ с использованием данного теста [13]. При выполнении теста ПВУ при открытом лазе, а также при лазе, замаскированном стружкой, различия в проявлении исполнительных функций обнаруживались не в успешности решения этих этапов, а видимо, в ЛП реализации решения (с более быстрой реализацией попадания в темноту у мышей “плюс” групп) (рис. 2а, 2б). Поведение мышей двух сублиний сравнивали также в тесте на гипонеофагию, в котором животному предлагали новую пищу (сыр) в новой (но не пугающей) обстановке. Показатели этого теста, оценивающие реакцию на новое (являющейся также компонентом когнитивных способностей животных), были более четко выражены у мышей “плюс” групп (данные не представлены). Следует отметить, что в литературе по анализу когнитивного поведения лабораторных грызунов (т.е. по их способности к решению элементарных логических задач) аналогов представленного исследования нет. В настоящее время основное внимание исследователей как в области нейрогенетики в целом, так и в части роли генотипа в экспрессии когнитивных признаков, занимает анализ модуляции экспрессии большого числа генов у генетически измененных животных, и подобный спи-

сок работ насчитывает многие десятки исследований. Особенно много таких данных получено в исследованиях геноза заболеваний центральной нервной системы [14–16 и др.], а экспериментальный подход с использованием батареи когнитивных тестов в этих задачах достаточно популярен [10, 17, 18 и др.]. Однако селекционных экспериментов практически не проводится и, в целом, эта область нейробиологии, несмотря на большой прогресс в выявлении важных для когнитивных функций структур мозга, сигнальных путей и групп специфических нейронов, остается пока недостаточно исследованной.

Таким образом, в данном исследовании впервые продемонстрированы достоверные различия в решении элементарной логической задачи, т.е. различия в экспрессии “исполнительных функций” у мышей, которые прошли 3 поколения селекции на “успешность” и “не-успешность” решения теста на “неисчезаемость”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования был одобрен Комиссией по биоэтике МГУ на заседании № 49 от 18.06.2014.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121032500080-8), поддержана РФФИ (грант № 20-015-00287) и госпрограммой N AAA-A16-116021660055-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Graybeal C., Bachu M., Mozhui K., et al.* Strains and stressors: an analysis of touchscreen learning in genetically diverse mouse strains // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 2.
2. *Saez I., Set E., Hsu M.* From genes to behavior: placing cognitive models in the context of biological pathways // *Front. Neurosci*. 2014. V. 8. P. 336.
3. *Sauce B., Matzel L. D.* The paradox of intelligence: Heritability and malleability coexist in hidden gene-environment interplay // *Psychol. Bull.* 2018. V. 144. № 1. P. 26–47.
4. *Bainbridge N.K., Koselke L.R., Jeon J., et al.* Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype // *Behav. Brain Res.* 2008. V. 190. № 1. P. 50–58.
5. *Too L.K., Li K.M., Suarna C., et al.* Deletion of TDO2, IDO-1 and IDO-2 differentially affects mouse behavior and cognitive function // *Behav. Brain Res.* 2016. V. 312. P. 102–117.
6. *Nolan S.O., Lugo J.N.* Reversal learning paradigm reveals deficits in cognitive flexibility in the Fmr1 knockout male mouse // *F1000Res*. 2018. V. 7. P. 711.
7. *Granseth B., Andersson F.K., Lindström S.H.* The initial stage of reversal learning is impaired in mice hemizygous for the vesicular glutamate transporter (VGluT1) // *Genes Brain Behav.* 2015. V. 14. № 6. P. 477–485.
8. *Manning E.E., Dombrovski A.Y., Torregrossa M.M., et al.* Impaired instrumental reversal learning is associated with increased medial prefrontal cortex activity in Sapap3 knockout mouse model of compulsive behavior // *Neuropsychopharmacology*. 2019. V. 44. № 8. P. 1494–1504.
9. *Перепелкина О.В., Лильн И.Г., Маркина Н.В. и др.* Первый опыт селекции лабораторных мышей на высокую способность к экстраполяции. В кн.: *Формирование поведения животных в норме и патологии: К 100-летию со дня рождения Л.В. Крушинского (1911–1984)*. М.: Языки славянских культур С. 263–296.
10. *Galsworthy M.J., Paya-Cano J.L., Liu L., et al.* Assessing reliability, heritability and general cognitive ability in a battery of cognitive tasks for laboratory mice // *Behav. Genet.* 2005. V. 35. № 5. P. 675–692.
11. *Перепелкина О.В., Тарасова А.Ю., Огиенко Н.А. и др.* Вес мозга и когнитивные способности лабораторной мыши // *Успехи современной биологии* // 2019. Т. 139. № 5. С. 434–445.
12. *Yegla B., Foster T.C., Kumar A.* Behavior model for assessing decline in executive function during aging and neurodegenerative diseases // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 2011. P. 441–449.
13. *Ben Abdallah N.M., Fuss J., Trusel M., et al.* The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for exploring impairments of general cognition and executive functions in mouse models of schizophrenia // *Exp. Neurol.* 2011. V. 227. № 1. P. 42–52.
14. *Giménez-Llort L., Schiffmann S.N., Schmidt T., et al.* Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2007. V. 87. № 1. P. 42–56.
15. *Li Q., Chan S.Y., Wong K.K., et al.* Tspyl2 Loss-of-function causes neurodevelopmental brain and behavior abnormalities in mice // *Behav. Genet.* 2016. V. 46. № 4. P. 529–537.
16. *Hunsaker M.R.* The importance of considering all attributes of memory in behavioral endophenotyping of mouse models of genetic disease // *Behav. Neurosci.* 2012. V. 126. № 3. P. 371–380.
17. *Locurto C., Benoit A., Crowley C., et al.* The structure of individual differences in batteries of rapid acquisition tasks in mice // *J. Comp. Psychol.* 2006. V. 120. № 4. P. 378–388.
18. *Ene H.M., Kara N.Z., Barak N., et al.* Effects of repeated asenapine in a battery of tests for anxiety-like behaviours in mice // *Acta Neuropsychiatr.* 2016. V. 28. № 2. P. 85–91.

SELECTION OF LABORATORY MICE FOR THE COGNITIVE TASK SUCCESSFUL SOLUTION AND FOR THE INABILITY TO SOLVE IT

O. V. Perepelkina^{a,#} and I. I. Poletaeva^a

^a *Biology Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS K.V. Anokhin

Using the selected mouse strain Ex as the founding population (selection for extrapolation ability) three selection generations of mice were obtained, which were selected for successful solution of object permanence test (“plus” sub-strain) and for lack of such solution (“minus” sub-strain). The successful solution required not only the ability to operate the object permanence rule (by J. Piaget), but the performance of complicated action (executive function) was significantly higher in plus-substrain, and this is the unique example of successful selection for cognitive trait.

Keywords: elementary logic task, selection experiment, puzzle-box, object permanence rule, laboratory mice

УДК 618.19-006.6-033.2:577.21

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ УРОВНЯ БЕЛКОВ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ С ПРОЦЕССАМИ ПРОТЕОЛИЗА И ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2021 г. Е. Е. Середина^{1,*}, Е. С. Колегова¹, Г. В. Какурина¹, Е. А. Сиденко¹,
Д. А. Коршунов¹, И. В. Кондакова¹

Представлено академиком РАН Е.Л. Чойнозовым

Поступило 27.02.2021 г.

После доработки 29.03.2021 г.

Принято к публикации 31.03.2021 г.

Биологическая агрессивность опухоли определяется способностью опухолевых клеток к инвазии и метастазированию, что является следствием приобретения ими целого ряда фенотипических характеристик. Во время миграции клеток происходит ремоделирование актинового цитоскелета, которое осуществляется различными группами актин-связывающих белков, в регуляции которых важную роль играют протеасомы и кальпаины. Поэтому, изучение взаимосвязи белков, ассоциированных с клеточной подвижностью с процессами лимфогенного метастазирования, а также оценка регулирующей роли внутриклеточных протеаз в этих процессах чрезвычайно актуально для фундаментальной онкологии. В проведенном исследовании продемонстрированы ассоциации актин-связывающих белков с активностью протеасом и кальпаинов, характерные для опухолей и метастазов молочной железы, предложена возможная схема взаимосвязи внутриклеточных систем с актин-связывающими белками. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о процессах опухолевой прогрессии, а также могут быть использованы при поиске белков – мишеней для терапевтического воздействия при молекулярно-направленной терапии рака.

Ключевые слова: рак молочной железы, актин-связывающие белки, протеасомы, кальпаины, лимфогенные метастазы

DOI: 10.31857/S2686738921040223

Процесс метастазирования злокачественных опухолей связан с приобретением клетками подвижности, которая обеспечивается изменением экспрессионного профиля различных актин-связывающих белков и β -катенина. Во время миграции клеток происходит ремоделирование актинового цитоскелета, которое осуществляется различными группами актин-связывающих белков: мономер связывающие белки (тимозин-4 β); филамент – деполимеризующие белки (кофилин); белки, разрывающие актиновые филаменты и формирующие два фрагмента (гельзолин); поперечносвязывающие белки, участвующие в формировании пучков филаментов, их ветвлении и формировании трехмерных структур (белки Agr2/3 комплекса) [1]. В этих процессах важную роль отводят и β -катенину, который в клетке при-

сутствует в составе катенин-кадгеринных комплексов, обеспечивая адгезию и снижая миграционную активность клеток. С другой стороны, β -катенин является сигнальной молекулой в Wnt/ β -катенин сигнализации, участвует в активации генной транскрипции посредством трансактивации TCF/LEF транскрипционных факторов, что приводит к повышению миграции, снижению адгезии и повышению пролиферации клеток [2]. По данным литературы, при анализе экспрессии генов, кодирующих актин-связывающие белки, было продемонстрировано их участие при опухолевой прогрессии и на этапах метастазирования [3]. Важная роль в регуляции активности локомоторных белков отводится протеасомам и кальпаинам, которые постоянно и с высокой скоростью утилизируют белки, выполнившие свою функцию, к числу которых относятся локомоторные белки [4, 5]. Протеасомы в клетке представлены мультикаталитическими мультисубединичными комплексами и осуществляют протеолиз цитозольных, ядерных белков, превращение неактивных белков – предшественников в актив-

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

*e-mail: schaschovae@oncology.tomsk.ru

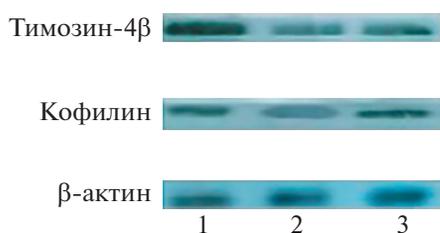


Рис. 1. Результаты Вестерн-блоттинг анализа содержания белков тимозин-4 β и кофилина в тканях молочной железы: 1 – в неизменной ткани; 2 – в опухолевой ткани; 3 – в ткани метастатических регионарных лимфоузлов.

ные, участвуют в образовании регуляторных пептидов, презентации комплекса гистосовместимости I типа, регуляции транскрипции генов [6, 7]. Протеасомы проявляют каспазаподобную (КПА), трипсинподобную (ТПА) и химотрипсинподобную (ХПА) активность [8]. При обширном лимфогенном метастазировании рака молочной железы (РМЖ) наблюдается значительное угнетение активности протеасом, которое может считаться неблагоприятным прогностическим признаком [9–11]. Другая внутриклеточная протеолитическая система – кальпаиновая, представлена кальций-зависимыми цистеиновыми протеазами, которые осуществляют частичный протеолиз и часто поставляют субстрат для дальнейшей деградации белка протеасомами. Кальпаины могут выполнять посттрансляционную модификацию белков, увеличивая функциональное разнообразие белков – мишеней. Показано, что протеолитическая деградация характерна для β -катенина, кофилина, гельзолина и Atp2/3 комплекса [12, 13]. Протеолитическая регуляция актин-связывающих белков исследована недостаточно, несмотря на то, что этот процесс может быть одним из основных в реализации метастазирования злокачественных опухолей.

Целью настоящего исследования явилась оценка белков, ассоциированных с клеточной подвижностью при лимфогенном метастазировании РМЖ и изучение их взаимосвязи с активностью протеасом и кальпаинов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Всего в исследование было включено 73 пациентки с первично операбельным инвазивным РМЖ (T₁₋₃N₁₋₂M₀), комбинированное лечение которых было начато с хирургического этапа, включало проведение оперативного вмешательства, выполняемого в объеме радикальной мастэктомии или органосохранной расширенной операции. Возраст пациенток, вошедших в исследование, варьировал от 28 до 75 лет (средний возраст больных 56 ± 11 лет). У всех пациенток РМЖ

диагноз был верифицирован морфологически. В представленной выборке у 71% пациенток было обнаружено от 1 до 3 метастатически-измененных регионарных лимфоузла, у 29% пациенток было обнаружено 4 и более метастатически-измененных регионарных лимфоузла. Материалом для исследования служили образцы неизменной, опухолевой ткани, а также ткань лимфогенных метастазов, полученные при выполнении радикального оперативного вмешательства. Под неизменной тканью подразумевали визуально неизменную ткань молочной железы, взятую на расстоянии 1–3 см от границы опухоли. Опухолевая ткань и ткань лимфоузла проходили обязательную морфологическую верификацию. Содержание актин-связывающих белков – кофилина и тимозина – оценивалось методом Вестерн-блоттинг в осветленном гомогенате тканей. При этом проводилась стандартизация значений изучаемых белков на содержание β -актина. Результаты выражали в процентах от содержания изучаемых белков в неизменной ткани (рис. 1). Содержание белков p45-Ser- β -катенин, Atp3 и гельзолина оценивали методом проточной цитофлюориметрии в цитокератин 18-позитивных клетках. При этом оценивался процент клеток, экспрессирующих изучаемые показатели, по отношению ко всем цитокератин 18-позитивным клеткам.

Активность протеасом и кальпаинов в тканях РМЖ определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу соответствующих флуорогенных олигопептидов Suc-LLVY-AMC и Cbz-LLG-AMC (Sigma, США). Для оценки активности примесных протеаз применяли специфический ингибитор протеасом – MG132 (Sigma, США) и ингибитор кальпаинов – MG101 (Sigma, США). Активность протеасом и кальпаинов выражали в единицах активности на 1 мг белка (10³ Ед/мг белка).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении содержания актин-связывающих белков в тканях пациенток РМЖ было показано, что уровень тимозина и кофилина достоверно выше в метастазах по сравнению с тканью первичной опухоли молочной железы. Содержание актин-разрывающего белка гельзолина (который функционально схож с кофилином), уровень белка Atp3, участвующего в связывании филаментов и входящего в состав Atp2/3 комплекса, а также содержание фосфорилированной по серину-45 фракции белка β -катенина не изменялось в метастазах по сравнению с первичной опухолью (табл. 1).

Таким образом, продемонстрировано различие в уровне мономера связывающего белка тимозина-4 β и филамент-деполимеризующего белка кофилина между тканью первичной опухоли и

Таблица 1. Процентное содержание актин-связывающих белков и p45-Ser β -катенина в ткани первичной опухоли и метастазах в регионарные лимфатические узлы у больных раком молочной железы

Изучаемый показатель, (%)	Первичная опухоль	Метастазы в регионарные лимфоузлы	<i>p</i>
Тимозин-4 β	19.0 [12.0; 23.0]	56.0 [32.5; 94.5]	<i>p</i> = 0.001
Кофилин	19.0 [14.0; 23.0]	152.0 [55.0; 237.0]	<i>p</i> = 0.0009
p45-Ser β -катенин	74.5 [29.0; 90.0]	77.0 [69.0; 93.0]	<i>p</i> > 0.05
Агр3	34.0 [27.0; 64.0]	47.0 [43.0; 56.0]	<i>p</i> > 0.05
Гельзолин	58.0 [33.0; 77.0]	72.0 [56.0; 77.0]	<i>p</i> > 0.05

Таблица 2. Изменение активности протеасомной и кальпаиновой внутриклеточных протеолитических систем в неизменной, опухолевой ткани и ткани метастатически измененных регионарных лимфатических узлов при раке молочной железы

Активность внутриклеточных протеаз	Неизменная ткань	Опухолевая ткань	Метастазы в регионарные лимфоузлы
ХПА	16.33 [8.22; 35.75]	39.66* [19.16; 80.90]	59.52*,** [29.39; 148.69]
КПА	17.2 [9.68; 40.01]	46.0* [19.57; 146.63]	43.63* [16.54; 110.95]
АК	34.95 [20.09; 128.57]	66.08* [32.30; 158.70]	59.40 [22.10; 185.90]

Примечание: * – значимость различий с группой неизменной ткани, *p* < 0.01; ** – значимость различий с группой опухолевая ткань, *p* < 0.05.

лимфогенными метастазами рака молочной железы.

В настоящее время различные аспекты влияния протеасом и кальпаинов на приобретение злокачественными клетками способности к метастазированию не в полной мере освещены в литературе, и, несомненно, нуждаются в дальнейшем изучении. Поэтому следующим этапом проведенного исследования явилось изучение активности внутриклеточных протеолитических систем в тканях РМЖ и их дальнейшее сопоставление с содержанием актин-связывающих белков в опухолевой ткани и лимфогенных метастазах при раке молочной железы.

При изучении активности протеасом и кальпаинов в тканях больных РМЖ выявлено усиление процессов внутриклеточного протеолиза в опухоли и ткани лимфогенных метастазов по сравнению с неизменными тканями. В опухоли продемонстрировано статистически значимое увеличение ХПА в 2.4 раза, КПА в 2.7 и активности кальпаинов (АК) в 1.9 раза соответственно, по сравнению с неизменной тканью. В ткани метастатически измененных регионарных лимфоузлов наблюдалось увеличение ХПА в 3.6 раза и КПА в 2.5 раза по сравнению с неизменной тканью. Кроме того, для ХПА было зарегистрировано статистически значимое увеличение в ряду: “неизменная ткань – опухоль – лимфогенные метастазы” (*p* = 0.04). КПА протеасом и активность кальпаинов в опухоли были сопоставимы с активностью в лимфоузлах (табл. 2).

Далее было проведено сопоставление активности внутриклеточных протеаз с содержанием актин-связывающих белков в опухолевой ткани и лимфогенных метастазах при раке молочной железы (рис. 2).

Выполненный корреляционный анализ показал, что в ткани рака молочной железы наблюдается отрицательная корреляционная зависимость между содержанием кофилина и другими актин-связывающими белками (тимозин-4 β , гельзолин, Агр3 и p45-Ser β -катенин), а также прямые взаимосвязи между p45-Ser- β -катенином, который регулирует адгезивные и миграционные способности клеток, и ХПА протеасом. На основе результатов корреляционного анализа нами предложена возможная схема взаимосвязи протеасомной, кальпаиновой внутриклеточных систем с актин-связывающими белками. Для ткани метастатических лимфоузлов выявлена взаимосвязь Р45-Ser- β -катенина и гельзолина с ХПА и КПА протеасом опухолевой ткани, тогда как содержание кофилина в метастазах прямо коррелировало с АК в опухоли, которые являются протеазамодуляторами и часто поставляют субстрат для дальнейшей деградации белка протеасомами (рис. 2).

Вероятно, для опухолей молочной железы характерен протеолиз p45-Ser- β -катенина, скорее всего, конъюгированного с полиубиквитином, 26S протеасомой либо гибридной формой протеасом, что согласуется с представлениями о неканоническом пути регуляции стабильности молекул β -катенина через убиквитин-протеасомную

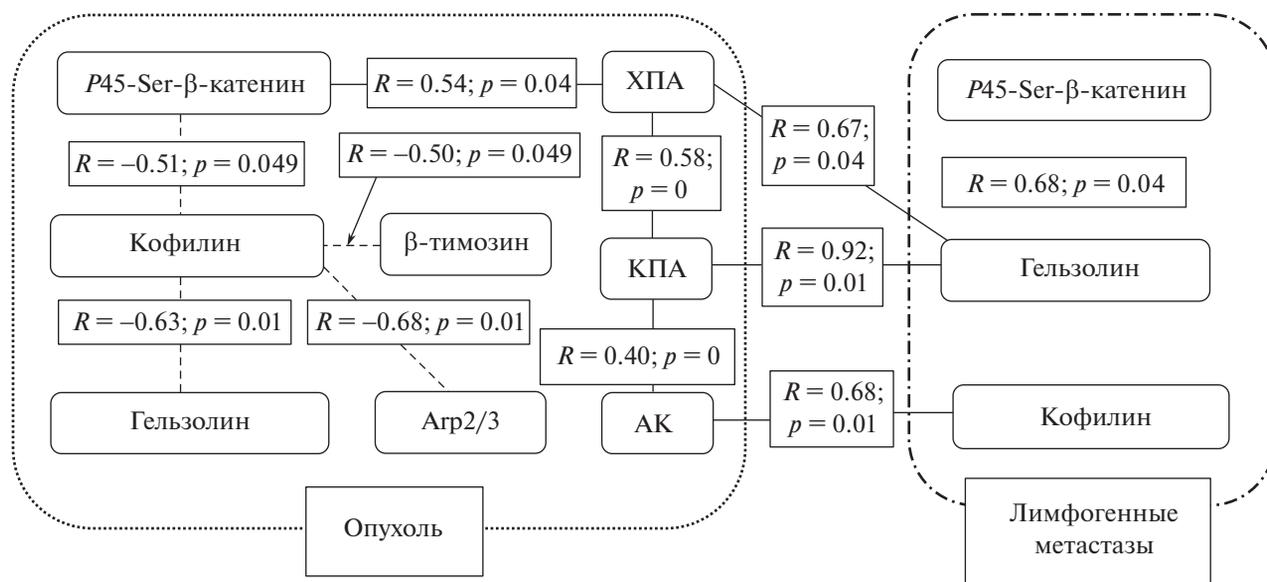


Рис. 2. Корреляционные взаимосвязи между актин-связывающими белками, фракциями β-катенина, активностью протеасом и кальпаинов.

Примечание: XПА – химотрипсинподобная активность протеасом; КПА – каспазаподобная активность протеасом; АК – активность кальпаинов; R – коэффициент корреляции Спирмена; – обратная корреляционная взаимосвязь; – прямая корреляционная взаимосвязь. p – уровень статистической значимости показателя.

систему [14]. А прямая корреляционная зависимость активности кальпаина в опухоли с содержанием деполимеризующего белка кофилина в метастазах может быть связана со способностью кальпаинов расщеплять адгезионные межклеточные контакты, которые способствуют выходу клеток в регионарные лимфоузлы [15]. Полученные результаты расширяют фундаментальные представления о процессах метастазирования злокачественных опухолей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации “Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека” с поправками 2000 г. Кроме того, было получено информированное согласие каждого пациента, включенного в исследование, а также разрешение этического комитета НИИ онкологии ТНИМЦ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *dos Remedios C.G., Chhabra D., Kekic M., et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments (Review) // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. № 2. P. 433–473.
2. *Guo X., Wang X., Wang Z., et al.* Site-specific proteasome phosphorylation controls cell proliferation and tumorigenesis // *Nat. Cell. Biol.* 2016. V. 18. № (2). P. 202–212.
3. *Какурина Г.В., Кондакова И.В., Спирина Л.В., и др.* Экспрессия генов, кодирующих белки клеточной подвижности, в развитии плоскоклеточного рака головы и шеи // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018. Т. 166. № 8. С. 209–212.
4. *Islam S.M.-A., Patel R., Bommarreddy R.R.* The modulation of actin dynamics via atypical protein kinase-C activated cofilin regulates metastasis of colorectal cancer cells // *Cell. Adh. Migr.* 2018. № 10. P. 1–15.
5. *Del Carmen Lafita-Navarro M., Conacci-Sorrell M.* Identification of calpain-activated protein functions // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1915. P. 149–160.
6. *Степанова А.А., Люпина Ю.В., Шарова Н.П. и др.* Нативная структура иммунных протеасом печени крыс // *Доклады Академии наук.* 2016. Т. 468. № 3. С. 339–341.
7. *Collins G.A., Goldberg A.L.* The logic of the 26S proteasome // *Cell.* 2017. V. 169. № 5. P. 792–806.
8. *Jung T., Grune T.* Structure of the proteasome // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012. V. 109. P. 1–39.
9. *Шашова Е.Е., Астахова Т.М., Плеханова А.С., и др.* Изменение химотрипсинподобной активности протеасом в развитии карцином молочной и щитовидной желез человека // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013. № 8. С. 209–211.
10. *Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., и др.* Изменение химотрипсинподобной и каспазаподобной активностей протеасом в зависимости

- от степени распространенности рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. 2013. № 5. С. 45–49.
11. *Шашова Е.Е., Колегова Е.С., Завьялов А.А., и др.* Изменение активности протеасом и кальпаинов при метастазировании рака легкого и рака молочной железы человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 163. № 4. С. 486–489.
 12. *Shortrede J.E., Uzair I.D., Neira F.J., et al.* Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells // *Mol Cell Endocrinol.* 2016. V. 430. P. 56–67.
 13. *Molinie N., Gautreau A.* The Arp2/3 regulatory system and its deregulation in cancer // *Physiological Reviews.* 2018. V. 98. № 1. P. 215–238.
 14. *Shang S., Hua F., Hu Z.W.* The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 20. P. 33972–33989.
 15. *Carragher N.O.* Assaying calpain activity // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 370. P. 109–120.

RELATIONSHIP ESTIMATION OF CELL MOBILITY PROTEINS LEVEL WITH PROCESSES OF PROTEOLYSIS AND LYMPHOGENIC METASTASIS IN BREAST CANCER

**E. E. Sereda^{a, #}, E. S. Kolegova^a, G. V. Kakurina^a, E. A. Sidenko^a,
D. A. Korshunov^a, and I. V. Kondakova^a**

^a *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: schaschovaee@oncology.tomsk.ru*

Presented by Academician of the RAS E.L. Choynozov

The biological aggressiveness of a tumor is determined by the ability of tumor cells to invade and metastasize which is a consequence of their acquisition of a number of phenotypic characteristics. Remodeling of the actin cytoskeleton occurs during cell migration which is carried out by various groups of actin binding proteins in the regulation of which proteasomes and calpains play an important role. Therefore the study of the relationship of proteins associated with cell motility with the processes of lymphogenous metastasis as well as the assessment of the regulatory role of intracellular proteases in these processes is extremely important for fundamental oncology. This study demonstrates the associations of actin binding proteins with the activity of proteasomes and calpain, which are specific for tumors and metastases of the mammary gland. We proposed a possible scheme of the relationship of intracellular systems with actin binding proteins. The results obtained expand the fundamental understanding of the processes of tumor progression and can also be used in the search for proteins-targets for therapeutic action in molecular targeted cancer therapy.

Keywords: breast cancer, actin binding proteins, proteasomes, calpains, lymphogenous metastases

УДК 577.3:599.323.4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТОНКОГО СКАНИРУЮЩЕГО ПУЧКА ПРОТОНОВ НА МЫШАХ *in vivo*

© 2021 г. Член-корреспондент РАН В. Е. Балакин^{1,*}, О. М. Розанова², Е. Н. Смирнова², Т. А. Белякова¹, А. Е. Шемяков^{1,2}, Н. С. Стрельникова¹

Поступило 17.03.2021 г.
После доработки 31.03.2021 г.
Принято к публикации 31.03.2021 г.

Изучено действие тонкого сканирующего пучка протонов в диапазоне доз 4.5–15 Гр на радиочувствительность мышей при облучении в двух областях кривой Брэгга по критериям 30-дневной выживаемости, динамики гибели, средней продолжительности жизни мышей. Были определены величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов до и в пике Брэгга относительно рентгеновского излучения, которые составили по показателю $LD_{50/30}$ 0.86 и 0.94 соответственно, а по критерию 30-суточной выживаемости в дозе 6.5 Гр – 0.83 и 0.84. При близких значениях ОБЭ для протонов в разных областях кривой Брэгга выявлены существенные различия в динамике течения лучевой болезни, что свидетельствует о разном повреждении критических систем и органов животных, а также индукции специфических компенсаторных механизмов, участвующих в формировании стресс-ответов на организменном уровне.

Ключевые слова: тонкий сканирующий пучок протонов, относительная биологическая эффективность, выживаемость, мыши

DOI: 10.31857/S2686738921040053

С каждым годом в мире растет число онкологических заболеваний, и в большинстве случаев лучевая терапия является основным средством лечения. Обычно в качестве лучевой терапии используют фотоны, которые характеризуются экспоненциальным уменьшением дозы, т.е. торможение частиц происходит в основном перед опухолью в здоровых тканях, что способствует появлению острых лучевых поражений после лечения. В настоящее время все активнее для лечения рака применяют протоны, преимущества которых связаны с их дозовым распределением, описываемым кривой Брэгга: относительно низкой дозой на входе и наличием пика Брэгга – максимального энерговыделения в конце пробега частицы на заранее заданной глубине, непосредственно в опухоли, что позволяет не повреждать

окружающие здоровые ткани, снижая вероятность побочных лучевых реакций [1]. Протонную терапию (ПТ) рассматривают как альтернативу традиционной лучевой терапии, особенно в педиатрии [2] и для лечения опухолей сложных локализаций, близко расположенных к критически важным органам, например, опухоли глаз [3], легких [4], простаты [5]. Хотя физические свойства протонов хорошо изучены, об особенностях их биологического действия известно гораздо меньше. В клинической практике коэффициент относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонного излучения относительно высокоэнергетичных фотонов равен 1.1 [6]. В последние годы фиксированное значение ОБЭ ставится под сомнение с позиции оценки безопасности, так как если доза в опухоли слишком низкая, то риск рецидива увеличивается, а если превышена, то возрастает вероятность возникновения побочных эффектов [7]. В работе, проведенной на фибробластах человека AG01522 и клетках глиомы U87 с использованием моноэнергетических протонов с энергией 62 МэВ, было показано, что ОБЭ изменяется с 1.0 на входе в ткани до 1.3–1.4 в пике Брэгга [8]. Основной проблемой при исследовании действия ускоренных частиц на биологические объекты является то, что величина ОБЭ

¹ Физико-технический центр Федерального государственного бюджетного учреждения науки Физический институт им. П.Н. Лебедева Российской академии наук, Протвино, Россия

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

*e-mail: balakin@ftcfian.ru

зависит от многих факторов, как биологического характера: вида, пола, возраста животного; линии культивируемых клеток млекопитающих; метода регистрации повреждений, концентрации кислорода в тканях, стадии клеточного цикла, условий культивирования *in vitro* и метаболизма *in vivo*, так и физико-технических характеристик облучения: способа доставки и расчета дозы, дозы за фракцию, величины линейной передачи энергии (ЛПЭ) частиц, состава и однородности пучка ионов и вторичного излучения. В последнее время медицинские центры для ПТ опухолей используют метод тонкого сканирующего пучка протонов (ТСПП), который обеспечивает наиболее эффективное лечение с модулированной интенсивностью, позволяя максимально снизить дозовую нагрузку на здоровые ткани. Дальнейшее улучшение качества ПТ можно достичь корректной оценкой ОБЭ по всему диапазону кривой Брэгга.

Большинство работ по определению величины ОБЭ протонов выполнено при облучении *in vitro* культур нормальных и опухолевых клеток с использованием низкоэнергетических пучков [9], и полученные результаты трудно экстраполировать для решения практических задач ПТ, при которой в современных центрах используют высокоэнергетические протоны. В данный момент начинают накапливаться экспериментальные данные по действию пучков протонов разных энергий, конфигураций и ЛПЭ на целый организм, которых пока недостаточно, и, как следствие, отсутствуют представления о специфике действия высокоэнергетических частиц на критические структуры и процессы в различных органах и тканях при тотальном или локальном облучении животных в дозах, рассчитанных для межпланетного полета, а также при дозах, которые планируют использовать для гипофракционированного облучения опухолей.

Целью работы являлись изучение радиочувствительности мышей в диапазоне доз 4.5–15 Гр после тотального облучения ТСПП в разных областях кривой Брэгга и определение коэффициента ОБЭ по тесту 30-суточной выживаемости.

Эксперименты проводили на 260 мышах самцах колонии SHK с массой тела 30–35 г, которых содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях [10], а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 8/2020 от 17.02.2020). Мыши были разделены на группы по 10–15 животных, и по отдельным экспериментальным точкам проведено 2–3 независимых эксперимента. Мышей облучали в пике и до

пика Брэгга в дозах 4.5–15 Гр. Облучение осуществлялось на протонном синхротроне (Комплекс ПТ “Прометеус”, ФТЦ ФИАН, Протвино) с применением технологии сканирующего пучка с одного направления в импульсном режиме (длительность импульса 200 мс, 1 импульс в 2 с) и сигмой пучка – 2.8–3.6 мм. Облучение животных проводилось путем сканирования пучком протонов всего тела с равномерным распределением дозы по всему объему. Перед облучением мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией ксилазин/золетиловой смеси (0.7/3.4 мг/кг). Животных по одному располагали перпендикулярно правой стороной тела к оси пучка на расстоянии 75 см от выпускного окна ускорителя. При облучении в модифицированном пике Брэгга перед контейнером с животным располагался 60 мм водный фантом, для смещения энергии протонов в диапазон более 70 МэВ, чтобы получить более однородное дозовое распределение в теле животного с хорошим градиентом доз на границах мишени. При облучении в модифицированном пике Брэгга мощность дозы была 0.82 Гр/мин, число частиц 1.51×10^{11} – 5.05×10^{11} в зависимости от дозы, энергия частиц на выходе из ускорителя составляла 91–123 МэВ. Среднее значение ЛПЭ, рассчитанное по программе планирования, в модифицированном пике было равно 2.5 ± 0.7 кэВ/мкм. При облучении до пика Брэгга энергия частиц составляла 150 МэВ, что соответствует ЛПЭ на плато 0.7 ± 0.04 кэВ/мкм, при мощности дозы 0.47 Гр/мин (число частиц 3.67×10^{11} – 1.22×10^{12}). Контролировали дозу клиническим дозиметром на основе алмазного детектора (ИФТП, Россия) и дозиметрической пленкой (ЕВТ2, США), погрешность поглощенной дозы протонов составляла около 5%.

Для определения коэффициента ОБЭ контрольные группы мышей были облучены жестким рентгеновским излучением (РИ) на установке РУТ (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин; Центр коллективного пользования “Источники излучения” ИБК, Пушкино). Облучение мышей РИ, которое является фотонным, происходило равномерно по всему телу. Животные этой группы также служили sham-контролем, так как подвергались анестезии и транспортировке к источникам облучения.

Затем в течение 30 сут после радиационного воздействия ежедневно учитывали число павших животных, а также мышей взвешивали дважды в неделю. По итогам наблюдений получали кривые выживаемости, по которым оценивали динамику гибели и среднюю продолжительность жизни (СПЖ) погибших от облучения мышей.

Полученные данные подвергали стандартной статистической обработке с вычислением среднего значения показателя и его ошибки. Достоверность различий между выборками оценивали

Таблица 1. Выживаемость и СПЖ после облучения ТСПП до и в пике Брэгга в дозах 4.5–15 Гр

Доза, Гр	До пика Брэгга		В пике Брэгга	
	Выживаемость, %	СПЖ, сут	Выживаемость, %	СПЖ, сут
4.5	93	29 ± 1	88	22 ± 7
6.5	64	16 ± 8	40	23 ± 8
8.5	33	10 ± 6	30	14 ± 9
10.5	11	13 ± 5	10	10 ± 3
12.5	0	6 ± 1	10	6 ± 4
15	0	6 ± 1	0	5 ± 3

с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Вероятность ошибки $p < 0.05$ считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

В табл. 1 представлены данные о выживаемости и СПЖ погибших мышей при облучении ТСПП до и в пике Брэгга в диапазоне доз 4.5–15 Гр.

Гибель животных в обоих вариантах облучения протонами зависела от дозы и наблюдалась при всех исследованных дозах. После облучения в дозах 4.5 и 6.5 Гр, как до, так и в пике Брэгга, гибель мышей начиналась с 10-го дня, что свидетельствует о развитии костномозговой формы хронической лучевой болезни [11]. Гибель мышей, облученных протонами в пике Брэгга в дозах 8.5 Гр и выше, начиналась на 3–5-й день, что свидетельствует об индукции кишечной формы острой лучевой болезни, а при облучении до пика Брэгга такое течение болезни наблюдалось только после облучения в дозе 12.5 Гр, что сопровождалось падением веса животных на 23–27% перед гибелью.

После действия РИ в дозе 8.5 Гр более выражена была костномозговая форма лучевой болезни и 100% гибель наблюдалась к 14 сут в отличие от протонного излучения, после действия которого в пике Брэгга через 30 сут погибло 70%, а до пика – 67% мышей. СПЖ погибших от облучения мы-

шей также была дозозависимой, но достоверных отличий между исследуемыми группами не наблюдалось.

Для определения величины дозы ЛД_{50/30}, при которой выживает 50% животных в течение месяца и которая является базовой радиобиологической характеристикой излучения, в качестве метода преобразования кривых смертности был использован пробит-анализ [12]. На рис. 1 представлены результаты пробит-анализа, на основании которого были вычислены значения ЛД_{50/30}: для ТСПП до пика Брэгга оно равнялось 7.2 Гр, в пике Брэгга – 6.6 Гр, а для РИ – 6.2 Гр.

По критерию значений ЛД_{50/30} была вычислена величина ОБЭ до и в пике Брэгга, которая составила 0.86 и 0.94 соответственно, статистически значимой разницы между величинами выявлено не было. Исходя из того, что полученные значения ЛД_{50/30} лежали в диапазоне доз 6.2–7.2 Гр, для оценки ОБЭ по критерию 30-суточной выживаемости была выбрана доза 6.5 Гр.

Из рис. 2 видно, что, несмотря на то, что после облучения мышей в дозе 6.5 Гр протонами с разной ЛПЭ разница в динамике гибели животных незначительная, но к 30 сут в пике Брэгга их погибает 60%, а до пика – 36%. На основании этих результатов были рассчитаны значения коэффи-

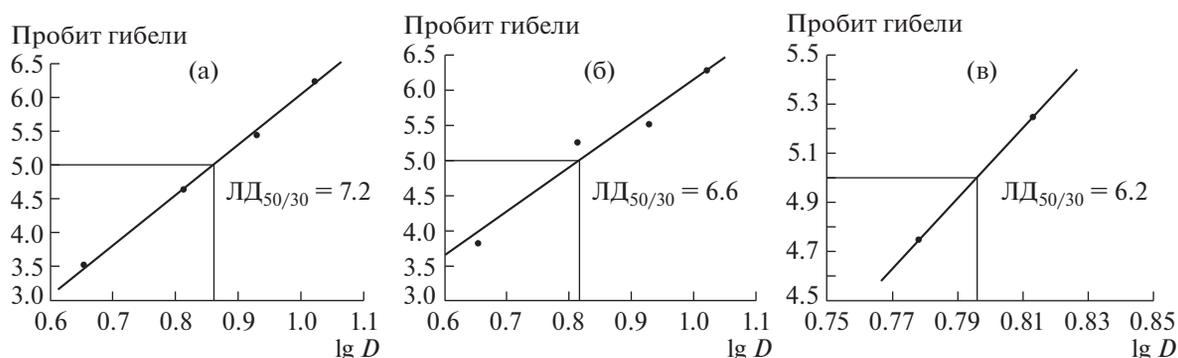


Рис. 1. Пробит-функция 30-суточной выживаемости мышей после воздействия ТСПП (а) до пика Брэгга ($y = 7.3 \log D - 1.3$); (б) в пике Брэгга ($y = 6.3 \log D - 0.2$); (в) рентгеновское излучение ($y = 14.4 \log D - 6.4$).

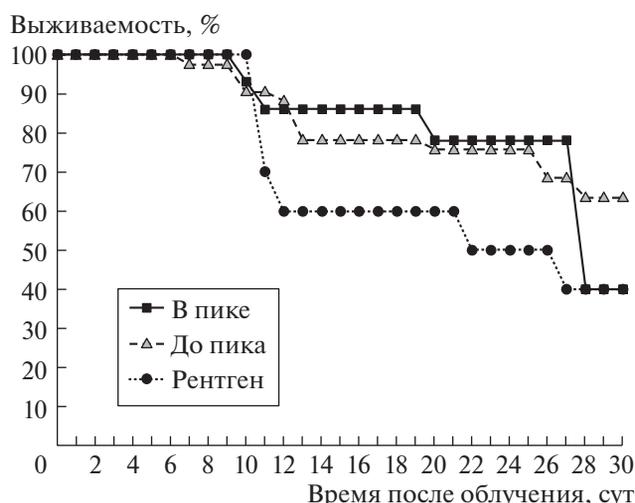


Рис. 2. Динамика гибели мышей после облучения ТСПП и рентгеновским излучением в дозе 6.5 Гр.

циентов ОБЭ при облучении мышей ТСПП в разных участках кривой Брэгга относительно РИ по интегральному показателю — площади под кривыми выживаемости животных в течение 30 сут. Коэффициент ОБЭ до пика Брэгга составил 0.84, а в пике — 0.83. Полученные значения согласуются с результатами ряда исследований определения ОБЭ по острым кожным реакциям мышей при облучении пучком протонов в пике Брэгга задней лапы и жесткого РИ, где величина ОБЭ находится в диапазоне 0.85–0.97 [13, 14]. Ранее нами было определено значение ОБЭ при общем облучении ТСПП мышей в пике Брэгга в дозе 1.5 Гр через 28 ч после воздействия по критерию цитогенетических нарушений в эритроцитах костного мозга, равное 1.15 [15]. Это значение также хорошо согласуется с данными, полученными на культурах клеток [16], и отражает раннюю радиочувствительность стволовых клеток костного мозга, одного из важнейших органов кроветворной и иммунной систем, обладающим огромным репопуляционным потенциалом. В данной работе по критерию выживаемости при облучении мышей в пике Брэгга значения ОБЭ были ниже и составили 0.83 и 0.94, что показывает отсроченную реализацию ответов всех чувствительных к облучению органов, обладающих быстроделющимися клетками, прежде всего костного мозга и желудочно-кишечного тракта. Кроме того, в нашей работе ОБЭ рассчитывалось относительно РИ с ЛПЭ, сопоставимой с ЛПЭ протонов в пике Брэгга, и ОБЭ которого по отношению к γ -излучению ^{60}Co равен 1.1–1.2 [17], поэтому полученные нами коэффициенты *in vivo* близки к значениям, принятым на данный момент в клиниках. Полученные нами результаты демонстрируют также зависимость значения ОБЭ от объекта, дозы, критериев регистрации повре-

ждений и контрольного облучения, относительно которого высчитывается коэффициент.

Используемая в нашей работе экспериментальная модель позволила определить величину ОБЭ несколькими способами на основе кривых выживаемости мышей в диапазоне доз, которые применяются также для оценки ОБЭ в условиях *in vitro* на культурах клеток млекопитающих. Ранее на других ускорителях с использованием пассивно-рассеянных пучков протонов разных энергий на животных были получены противоречивые данные о связи ЛПЭ с ОБЭ в отношении отдаленных последствий облучения [18]. В экспериментах на культурах и тканях млекопитающих при оценке краткосрочных эффектов протонов при аналогичных дозах было определено, что в низком диапазоне ЛПЭ 0.3–10 кэВ/мкм величина ОБЭ протонов ниже или близка 1, и при 2–3-кратном увеличении ЛПЭ не наблюдается роста ОБЭ [19], в отличие от других ускоренных частиц, которые применяются в радиотерапии, ионов углерода и нейтронов, ЛПЭ которых значительно выше.

Таким образом, несмотря на близкие значения ОБЭ протонного излучения в разных областях кривой Брэгга, по динамике гибели мышей были выявлены резкие различия в развитии лучевой болезни в зависимости от дозы облучения, что свидетельствует о специфике повреждений критических систем и органов, индукции разнонаправленных компенсаторных механизмов, участвующих в формировании отдаленных реакций на тканевом и организменном уровне, приводящих в итоге к одинаковой гибели животных. В нашей работе при использовании нового способа доставки дозы протонов с помощью сканирования мишени баллистическим пучком частиц при об-

лучении до и в пике Брэгга было показано, что ОБЭ по критерию выживаемости мышей близко к 1 и не зависит от ЛПЭ. Полученные данные позволят более широко использовать возможности нового комплекса “Прометеус” для ПТ, разработки и поиска новых радиопротекторов, а также корректировать радиационные риски от галактических космических лучей при длительных полетах.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа по определению величины относительной биологической эффективности тонкого сканирующего пучка протонов на мышах *in vivo* выполнена на базе ФТЦ ФГБУН Физический институт им. П.Н. Лебедева и ФГБУН ИТЭБ РАН в рамках выполнения фундаментальных научных исследований по темам ГЗ при частичной финансовой поддержке договора НИР № 06/20 между ФТЦ ФИАН и ИТЭБ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Исследования проводили в соответствии с требованиями Федерации европейских научных ассоциаций по содержанию и использованию лабораторных животных в научных исследованиях (Federation of European laboratory animal science association, FELASA), а план экспериментов был одобрен Комиссией ИТЭБ РАН по биологической безопасности и биоэтике (протокол № 8/2020 от 17.02.2020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ilicic K., Combs S.E., Schmid, T.E.* New insights in the relative radiobiological effectiveness of proton irradiation // *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 2018. V. 13. № 6.
2. *Thomas H., Timmermann B.* Paediatric proton therapy // *Br. J. Radiol.* 2020. V. 93. № 1107.
3. *Hu W., Hu J., Gao J., et al.* Outcomes of orbital malignancies treated with eye-sparing surgery and adjuvant particle radiotherapy: a retrospective study // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 776.
4. *Vyfhuis M.A.L., Onyeuku N., Diwanji T., et al.* Advances in proton therapy in lung cancer // *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2018. V. 12.
5. *Kamran S.C., Light J.O., Efstathiou J.A.* Proton versus photon-based radiation therapy for prostate cancer: emerging evidence and considerations in the era of value-based cancer care // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2019. V. 22. № 4. P. 509–521.
6. *Paganetti H., Blakely E., Carabe-Fernandez A., et al.* Report of the AAPM TG-256 on the relative biological effectiveness of proton beams in radiation therapy // *Med. Phys.* 2019. V. 46. № 3.
7. *Mohan R., Peeler C.R., Guan F., et al.* Radiobiological issues in proton therapy // *Acta Oncol.* 2017. V. 56. № 11. P. 1367–1373.
8. *Chaudhary P., Marshall T.I., Perozziello F.M., et al.* Relative biological effectiveness variation along monoenergetic and modulated Bragg peaks of a 62-MeV therapeutic proton beam: a preclinical assessment // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. V. 90. № 1. P. 27–35.
9. *Bao C., Sun Y., Dong Y., et al.* The relative biological effectiveness of proton and carbon ion beams in photon-sensitive and resistant nasopharyngeal cancer cells // *Translational Cancer Research.* 2018. V. 7. № 1. P. 170–179.
10. *Smith J., van den Broek F., Martorell J., et al.* Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of the FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments // *Laboratory Animals.* 2007. V. 41. № 2. P. 143–160.
11. *Ярмоленко С.П., Вайнсон А.А.* Радиобиология человека и животных. М.: Высшая школа; 2004.
12. *Ульяненко С.Е., Корякин С.Н., Исаева Е.В., и др.* Оценка биологической эффективности нейтронного излучения реактора БАРС-6 с различной мощностью дозы по критерию выживаемости мышей // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2016. Т. 56. № 6. С. 598–605.
13. *Tatsuzaki H., Inada T., Shimizu T., et al.* Early skin reaction following 250 MeV proton peak irradiation // *J. Radiat. Res.* 1987. V. 28. № 2. P. 150–155.
14. *Sorensen B.S., Bassler N., Nielsen S., et al.* Relative biological effectiveness (RBE) and distal edge effects of proton radiation on early damage in vivo // *Acta Oncol.* 2017. V. 56. № 11. P. 1387–1391.
15. *Balakin V.E., Rozanova O.M., Smirnova E.N., et al.* The Effect of Low and Medium Doses of Proton Pencil Scanning Beam on the Blood-Forming Organs during Total Irradiation of Mice // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 494. № 1. P. 231–234.
16. *Koryakina E., Troshina M., Potetnya V., et al.* Biological efficiency of a scanning proton beam under different irradiation modes in vitro. In: Book of Abstracts. Eighth international conference on radiation in various fields of research; Virtual conference. 2020. 125.
17. *Spadinger I., Palcic B.* The relative biological effectiveness of 60Co gamma-rays, 55 kVp X-rays, 250 kVp X-rays, and 11 MeV electrons at low doses // *Int. J. Radiat. Biol.* 1992. V. 61. № 3. P. 345–353.
18. *Жуковская Н.Е., Черножукова Е.М., ред.* Проблемы космической биологии. Т. 60. Биофизические основы действия космической радиации и излучений ускорителей. Л.: Наука; 1989.
19. *Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Наседкина Н.В. и др.* Равномерность биологической дозы в распределенном пике Брэгга терапевтической установки со сканирующим пучком протонов // *Вопросы онкологии.* 2019. Т. 65. № 4. С. 532–536.

ASSESSMENT OF THE RELATIVE BIOLOGICAL EFFICIENCY OF PENCIL BEAM SCANNING OF PROTONS IN MICE *IN VIVO*

Corresponding Member of the RAS V. E. Balakin^{a,#}, O. M. Rozanova^b, E. N. Smirnova^b, T. A. Belyakova^a,
A. E. Shemyakov^{a,b}, and N. I. Strelnikova^a

^a Physical Technical Center, P.N. Lebedev Physical Institute of the Russian Academy of Sciences, Protvino, Russian Federation

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation

[#]e-mail: balakin@ftcfian.ru

The effect of proton pencil beam scanning in the dose range of 4.5–15 Gy on the radiosensitivity of mice under irradiation in two regions of the Bragg curve was studied according to the criteria of 30-day survival, dynamics of death, and average lifespan of mice. The relative biological effectiveness (RBE) value, determined by the LD_{50/30} index, of protons relative to X-ray radiation before the Bragg peak is 0.86, in the Bragg peak it is 0.94, and as calculation by the criterion of 30-day survival, at a dose of 6.5 Gy it was 0.83 and 0.84, respectively. With similar RBE values for protons in different regions of the Bragg curve, significant differences were revealed in the dynamics of the course of radiation sickness, which indicates different damage to critical systems and organs of animals and the induction of compensatory mechanisms involved in the formation of stress responses at the organismal level.

Keywords: pencil beam scanning of protons, relative biological effectiveness value, survival, mice

УДК 577.332.23: 539.199

МНОГОРАЗОВАЯ СИСТЕМА ОБНАРУЖЕНИЯ ФЕНОЛА В ВОДНОЙ СРЕДЕ НА ОСНОВЕ НАНОАЛМАЗОВ И ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ОКСИДАЗЫ ИЗ БАЗИДИОМИЦЕТА *Neonothopanus nambi*

© 2021 г. Н. О. Ронжин^{1,*}, О. А. Могильная¹, Е. Д. Посохина¹, В. С. Бондарь¹

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи

Поступило 01.12.2020 г.

После доработки 31.03.2021 г.

Принято к публикации 01.04.2021 г.

Адсорбцией экстраклеточной оксидазы из гриба *Neonothopanus nambi* на модифицированные наноалмазы (МНА) детонационного синтеза создана многоразовая система определения фенола в водной среде. Установлено, что фермент прочно связывается с МНА и проявляет каталитическую активность в реакции соокисления фенола с 4-аминоантипирином без добавки пероксида водорода. Обнаружено, что в присутствии комплекса МНА–оксидаза регистрируется значительно (на порядок) больший выход продукта реакции по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента, обсуждается механизм выявленного эффекта. В модельных экспериментах продемонстрирована многократность применения комплекса МНА–оксидаза для тестирования фенола в водных образцах. Установлено, что иммобилизованный фермент проявляет функциональную активность при длительном (2 мес) хранении комплекса МНА–оксидаза при 4°C. Полученные данные создают предпосылки для использования созданной системы в экологическом мониторинге загрязнений водной среды фенолом.

Ключевые слова: наноалмаз, экстраклеточная оксидаза, базидиомицет *Neonothopanus nambi*, система индикации, фенол

DOI: 10.31857/S268673892104020X

Ферменты базидиальных грибов перспективны для применения в аналитических приложениях. В частности, большой интерес исследователей связан с изучением применимости экстраклеточных оксидаз грибов в создании диагностических тест-систем [1–4]. При этом следует сказать, что широкое применение секретлируемых оксидаз базидиомицетов в биомедицинской аналитике сдерживается их недостаточной стабильностью. Для повышения резистентности грибных оксидаз к воздействию негативных факторов реакционной среды и сохранения каталитической функции при многократном использовании осуществляется их иммобилизация на разных типах носителей, в том числе наночастицах [5–8]. Одним из перспективных носителей для иммобилизации ферментов (например, экстраклеточных оксидаз базидиомицетов) являются модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, которые

ранее были успешно использованы в создании индикаторных тест-систем для биомедицинской диагностики [9, 10].

Недавно в водных экстрактах из мицелия базидиомицета *Neonothopanus nambi*, содержащих экстраклеточные оксидазы гриба, мы обнаружили ФАД-содержащий фермент, который в отличие от известных пероксидаз катализировал реакцию соокисления фенола с 4-аминоантипирином (4-ААП) без добавления экзогенного пероксида водорода [11]. Результаты проведенных исследований позволили высказать гипотезу, что данный фермент является оксидазой со смешанной функцией и прогнозировать его пригодность для аналитических целей.

Настоящая работа посвящена созданию на основе МНА и обнаруженной экстраклеточной оксидазы базидиомицета *N. nambi* индикаторной системы и оценке ее применимости для многократного определения фенола в водной среде.

Мицелий базидиомицета *N. nambi* IBSO 3293 из Коллекции микроорганизмов ССИБСО 836 (ИБФ СО РАН, ФИЦ “КНЦ СО РАН”, Красноярск) был использован для выделения экстраклеточных грибных ферментов. Биомассу мицелия в

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

*e-mail: roniol@mail.ru

виде пеллет шарообразной формы получали разработанной нами ранее технологией выращивания данного гриба в погруженных условиях с использованием картофельно-сахарозной среды ("HiMedia Laboratory", Индия). Экстраклеточную оксидазу, катализирующую соокисление фенола с 4-ААП без участия экзогенной перекиси водорода, выделяли из мицелия *N. nambi* способом, изложенным нами в предыдущей работе [11]. Процедура выделения включала: обработку суспензии пеллет мицелия β -глюкозидазой ("Serva", Германия) в деионизованной (ДИ) воде (Milli-Q system, "Millipore", США) для извлечения экстраклеточных ферментов гриба, концентрирование водного экстракта, содержащего экстрагированные ферменты и их разделение гель-фильтрационной хроматографией концентрата на колонке с Sephadex G-200 ("Pharmacia", Швеция) с использованием в качестве элюента водного раствора 50 мМ хлорида натрия.

После хроматографии фракции, содержащие наибольшую активность изучаемого фермента, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 10 кДа ("EMD Millipore Amicon, Darmstadt", Германия). При концентрировании в образце проводили трехкратную замену ДИ воды для более полного удаления остатков элюента. Полученный концентрат (финальный препарат экстраклеточной оксидазы) использовали в экспериментах. Белковый состав финального препарата оценивали с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле [12], используя в качестве маркеров набор белков фирмы "Invitrogen Corporation" (США) с молекулярными массами 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа соответственно.

Активность изучаемой оксидазы во фракциях после хроматографии и финальном препарате оценивали реакцией соокисления фенола с 4-ААП. Для тестирования использовали 4-ААП (1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразолон) квалификации ч.д.а. ("Реахим", Россия) и фенол ("Fluka", Германия), растворы реагентов готовили *in situ* в ДИ воде. При измерении активности фермента реакционная смесь (600 мкл) содержала 5.96 мМ фенола, 0.49 мМ 4-ААП и 100 мкл тестируемого образца. После добавления всех компонентов реакции пробы перемешивали 3 с на Vortex-Genie 2 g-560E ("Scientific Industries, Inc.," США) и инкубировали 30 мин при 22°C. Уровень оксидазной активности в пробах оценивали по выходу цветного продукта реакции (хинонимин), который регистрировали спектрофотометрически (UV-1800, "Shimadzu", Япония) по величине поглощения при длине волны 506 нм. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка. Концентрацию белка в образцах определяли микробиуретовым методом по величине поглощения при 330 нм (UV-1800), исполь-

зуя БСА ("Sigma", США) в качестве стандарта [13].

Для иммобилизации выделенной из гриба *N. nambi* экстраклеточной оксидазы использовали МНА со средним размером кластеров (d_{50}) в гидрозолях 50 нм (Zetasizer Nano ZS, "Malvern Instruments Ltd.", Англия), которые получали из коммерческих детонационных наноалмазов (ООО "Реал-Дзержинск", Россия) разработанным ранее способом [14]. Сухой порошок МНА получали высушиванием гидрозоля в ротаторном испарителе Rotavapor R-215 ("Buchi", Швейцария). Для экспериментов готовили гидрозоль с концентрацией МНА 10.0 мг/мл добавлением ДИ воды к навеске порошка наночастиц.

В экспериментах использованы также: катализа из печени быка (активность фермента – 80 000 U/mg) ("Serva", Германия), ФАД ("Sigma", США), соли металлов $FeSO_4$ и $CuSO_4$ квалификации ч.д.а. ("Реахим", Россия). Для исследований растворы перечисленных реагентов готовили *in situ* в ДИ воде.

Комплекс МНА–оксидаза получали адсорбцией фермента на наночастицы. Для этого финальный ферментный препарат смешивали с гидрозодем МНА при весовом соотношении компонентов 1 : 3 (белок : наночастицы). Полученную суспензию инкубировали при 25°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин (шейкер OS-10, "BIOSAN", Латвия). МНА с адсорбированным ферментом собирали центрифугированием при 16 000 g (Centrifuge 5415R, "Eppendorf", Германия) в течение 10 мин при 4°C. Супернатант отбирали для оценки количества фермента, не связанного с МНА. Полученный осадок трижды отмывали раствором 120 мМ NaCl для проверки десорбции оксидазы, иммобилизованной на МНА. Осадок наночастиц каждый раз ресуспендировали в новой порции промыточного раствора, собирали центрифугированием и отбирали супернатант для оценки оксидазной активности. Отмытый комплекс МНА–оксидаза ресуспендировали в ДИ воде и использовали для экспериментов.

Тестирование активности фермента, иммобилизованного на МНА, проводили так же, как изложено выше. После проведения реакции комплекс МНА–оксидаза удаляли из реакционной смеси центрифугированием (Centrifuge 5415R) и определяли в супернатанте количество образовавшегося продукта. Активность фермента выражали в единицах оптической плотности на 1 мг белка, адсорбированного на наночастицы. При изучении применимости полученной индикаторной системы (комплекс МНА–оксидаза) для многократного определения фенола использовали водные пробы с одинаковой концентрацией аналита. В этом случае после проведения реакции

комплекс собирали центрифугированием и отбирали супернатант для спектральной оценки (UV-1800) образовавшегося продукта. Осадок трижды промывали ДИ водой для удаления остатков компонентов и продукта реакции, каждый раз ресуспендируя наночастицы в новой порции промывочного раствора и собирая центрифугированием. Отмытый комплекс МНА–оксидаза ресуспендировали в ДИ воде и добавкой фенола и 4-ААП вновь запускали реакцию.

Все эксперименты по оценке активности фермента и комплекса МНА–оксидаза проводили в трех повторностях. Планки погрешностей определяли как стандартное отклонение среднего значения из 3 повторов.

В данной работе мы установили, что экстраклеточная оксидаза, выделенная из базидиомицета *N. nambi* с помощью описанной выше технологии, хотя и не является гомогенной, однако имеет высокую степень чистоты (рис. 1). Из представленных данных SDS-электрофореза видно, что финальный препарат выделенного фермента содержит практически один доминантный белок с молекулярной массой около 60 кДа. При этом следует заметить, что величина молекулярной массы данного фермента в денатурирующих (рис. 1) условиях совпадает с величиной его молекулярной массы в нативных условиях, установленной нами ранее при гель-фильтрационной хроматографии [11]. Это позволяет говорить, что изучаемая экстраклеточная оксидаза базидиомицета *N. nambi* является мономерным ферментом.

В экспериментах мы показали, что инкубация финального препарата фермента с МНА сопровождается эффективной адсорбцией выделенной оксидазы на наночастицы. При выбранных экспериментальных условиях (весовое соотношение компонентов – белок : наночастицы, время инкубации, температура и скорость перемешивания смеси) на МНА адсорбировалось более 85% белка. При этом мы установили, что изучаемая оксидаза прочно связывается с наночастицами. По крайней мере, адсорбированный фермент не элюировался при последовательных трехкратных промывках комплекса МНА–оксидаза раствором 120 мМ хлорида натрия. Регистрируемый в суммарном объеме промывок выход продукта реакции соокисления составлял не более 1.5–2%, по сравнению с выходом в исходном препарате фермента.

В исследованиях мы установили, что иммобилизованная на МНА оксидаза проявляет свою каталитическую функцию и обеспечивает образование продукта в реакции соокисления фенола с 4-ААП без добавления пероксида водорода (рис. 2а). При этом следует сказать, что в сравнительных экспериментах мы обнаружили интересный эффект. Как видно из представленных данных

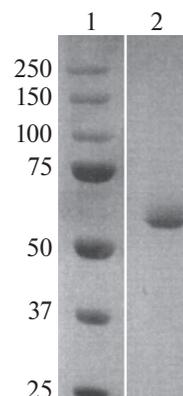


Рис. 1. Электрофореграмма финального препарата экстраклеточной оксидазы, выделенной из мицелия базидиомицета *N. nambi*. На треках SDS-электрофореза: 1 – маркерные белки с молекулярной массой 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа соответственно, 2 – препарат выделенного фермента.

(рис. 2а), в присутствии комплекса МНА–оксидаза наблюдается значительно больший (на порядок и более) выход продукта, по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента. Мы предполагаем следующий механизм этого эффекта.

В предыдущей работе мы высказали гипотезу, что изучаемая экстраклеточная оксидаза базидиомицета *N. nambi* является ферментом со смешанной функцией [11]. Согласно этой версии, данная оксидаза при наличии фенола в водной среде сначала генерирует пероксид водорода, который затем используется в реакции соокисления фенола с 4-ААП. Об образовании пероксида водорода под действием изучаемого фермента свидетельствуют результаты экспериментов, в которых было показано, что добавки в реакционную смесь экзогенной каталазы (концентрации в пробе 2–4 мкг/мл) снижают выход продукта реакции на 23–35%, по сравнению с контролем.

При этом ранее мы установили, что МНА катализируют образование цветного продукта в реакции окислительного азосочетания (фенол – 4-ААП – H_2O_2) за счет поверхностных микропримесей ионов железа и меди [15]. В этой работе было показано, что предварительная обработка МНА хелатором двухвалентных ионов ЭДТА с последующей отмывкой наночастиц от избытка реагента снижала выход продукта катализируемой ими реакции в два раза и более.

Учитывая изложенные выше факты, мы предполагаем, что более эффективное образование продукта при использовании комплекса МНА–оксидаза происходит двумя путями – ферментативно (за счет иммобилизованной оксидазы) и неферментативно (с участием ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} на поверхности МНА). В пользу этого свидетель-

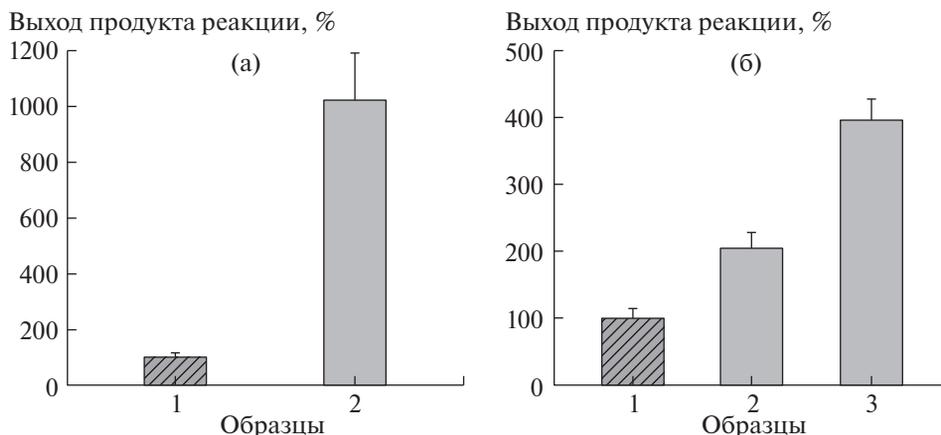


Рис. 2. Выход цветного продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП, отражающий эффективность функционирования экстраклеточной оксидазы из базидиомицета *N. nambi* в образцах с одинаковым количеством фермента. (а): 1 – свободная оксидаза (финальный препарат фермента), 2 – иммобилизованная оксидаза (комплекс МНА–фермент); (б): свободная оксидаза без (1) и в присутствии 50 μM Fe²⁺ (2) и 50 μM Cu²⁺ (3) соответственно. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы в рядах измерений на значение выхода продукта при измерении активности свободной оксидазы в финальном ферментном препарате.

ствуют результаты дополнительных исследований, в которых было установлено, что добавки ионов железа или меди (концентрация в пробе 50 μM) в содержащую свободный фермент реакционную смесь увеличивали выход продукта по сравнению с контролем в 2 и 4 раза соответственно (рис. 2б).

В свою очередь, полученные данные позволяют рассматривать МНА как усилитель реакции

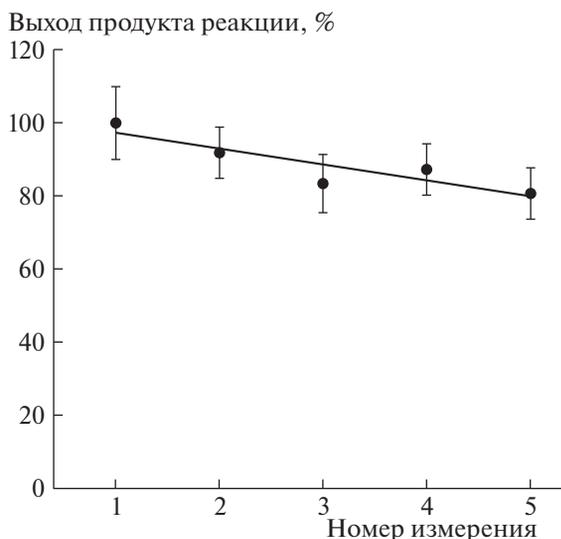


Рис. 3. Выход продукта реакции соокисления (фенол – 4-ААП) при последовательном многократном использовании комплекса МНА–оксидаза для определения фенола в водных пробах с одинаковой концентрацией аналита. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на значения выхода продукта при первом тестировании аналита.

соокисления и прогнозировать увеличение чувствительности системы индикации фенола, создаваемой на основе МНА и экстраклеточной оксидазы базидиомицета *N. nambi*. Мы предполагаем также, что эффект МНА, как усилителя, может быть использован и для повышения эффективности иных диагностических систем, создаваемых на основе МНА и других оксидазных ферментов, катализирующих образование пероксида водорода.

В модельных экспериментах нами была продемонстрирована применимость полученного индикаторного комплекса МНА–оксидаза для многократного определения фенола в водной среде (рис. 3). Из представленных данных видно, что, по крайней мере, при последовательном пятикратном использовании одного и того же образца комплекса для тестирования проб с одинаковой концентрацией аналита регистрируется практически одинаковый выход цветного продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП. Наблюдаемое в ходе последовательных измерений снижение выхода продукта может быть вызвано частичной инактивацией фермента. В частности, это может происходить при многократном ресуспендировании и осаждении комплекса МНА–оксидаза на стадиях его отмывок от остатков компонентов и продукта реакции.

В исследованиях мы установили, что иммобилизованная на МНА оксидаза из базидиомицета *N. nambi* проявляет функциональную активность и катализирует образование продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП после длительного хранения водной суспензии комплекса МНА–фермент при 4°C (рис. 4). Из представленных данных видно, что даже после двух месяцев хра-

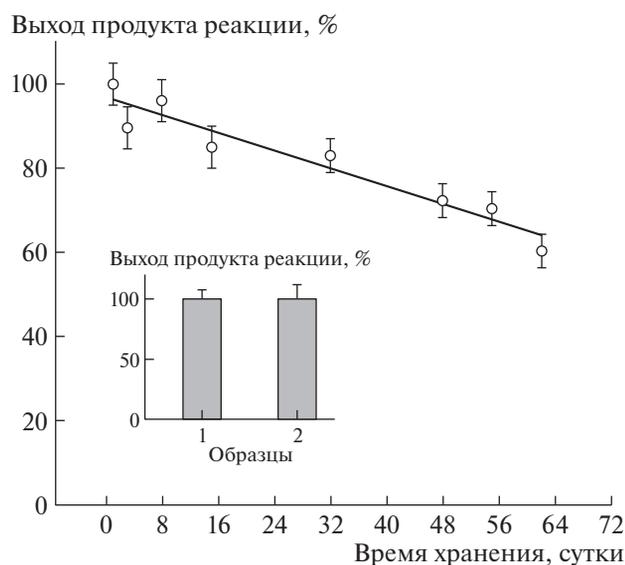


Рис. 4. Выход продукта реакции соокисления фенола с 4-ААП, катализируемой комплексом МНА–оксидаза, в зависимости от времени его хранения в ДИ воде при 4°C. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на значения выхода продукта при титровании аналита с использованием свежеприготовленного комплекса. На вставке приведен пример образования продукта реакции, катализируемой свободным ферментом после хранения его водных образцов два месяца при 4°C: без (1) и после (2) предварительной инкубации в присутствии 10 мМ ФАД. Данные рассчитаны на 1 мг белка и нормированы на значения выхода продукта в контроле.

нения в этих условиях адсорбированный на наночастицы фермент обеспечивал выход до 70% продукта реакции, по сравнению с выходом, который наблюдался при использовании свежеприготовленного комплекса МНА–оксидаза. Мы предполагаем, что снижение активности оксидазы при длительном хранении, как и частичная ее инактивация при многократном использовании комплекса МНА–оксидаза (рис. 3), не являются следствием потери ферментом ФАД. В модельных экспериментах было показано, что предварительная инкубация в присутствии ФАД (концентрации в пробе 0.1, 1.0 и 10 мМ) водных образцов фермента, длительное время (два месяца) хранившихся при 4°C, не увеличивала выход продукта реакции, по сравнению с контролем (рис. 4, вставка).

Таким образом, на основе экстраклеточной оксидазы из базидиомицета *N. nambi* в качестве сенсора и МНА детонационного синтеза, как носителя, создана система индикации фенола. Установлено, что при адсорбции фермент прочно связывается с наночастицами и проявляет каталитическую активность в реакции соокисления фенола с 4-ААП без участия экзогенного пероксида водорода. Обнаружен эффект значительно

большого выхода продукта реакции при использовании комплекса МНА–оксидаза, по сравнению с выходом в присутствии свободного фермента. Высказано предположение, что более эффективное образование продукта в присутствии комплекса обеспечивается участием ферментативного (за счет иммобилизованной оксидазы) и неферментативного (за счет примесей ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} на поверхности МНА) механизмов. В свою очередь, выявленный эффект позволяет прогнозировать увеличение чувствительности созданной системы индикации. В модельных экспериментах показана применимость комплекса МНА–оксидаза для многократного определения фенола в водных образцах. Установлено, что иммобилизованный на наночастицы фермент проявляет активность при длительном (два месяца) хранении водной суспензии комплекса МНА–оксидаза при 4°C и катализирует образование продукта реакции соокисления. В целом результаты выполненных исследований открывают перспективы конструирования на основе МНА и экстраклеточной оксидазы гриба *N. nambi* новой эффективной многоуровневой индикаторной системы для экологического мониторинга загрязнений водной среды фенолом. Получение данного фермента в гомогенном виде для установления его структуры и функциональных особенностей является приоритетной задачей дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knop D., Yarden O., Hadar Y. The Ligninolytic Peroxidases in the Genus *Pleurotus*: Divergence in Activities, Expression, and Potential Applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 1025–1038.
2. Li F., Ma W., Wu X., et al. Luminol, Horseradish Peroxidase, and Glucose Oxidase Ternary Functionalized Graphene Oxide for Ultrasensitive Glucose Sensing // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. P. 543–552.
3. Sarma R., Islam M., Running M., et al. Multienzyme Immobilized Polymeric Membrane reactor for the Transformation of a Lignin Model Compound // Polymers. 2018. V. 10. № 4. P. 463.
4. Galperin I., Javeed A., Luig H., et al. An aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization, and application in a 2-enzyme system // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 8021–8030.
5. Qiu H., Li Y., Ji G., et al. Immobilization of Lignin Peroxidase on Nanoporous Gold: Enzymatic Properties and in situ Release of H_2O_2 by Co-immobilized Glucose Oxidase // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 3837–3842.
6. Ghoshdastider U., Wu R., Trzaskowski B., et al. Molecular Effects of Encapsulation of Glucose Oxidase Dimer by Graphene // RSC Adv. 2015. V. 5. P. 13570–13578.

7. Koenig M., König U., Eichhorn K., et al. In-situ-Investigation of Enzyme Immobilization on Polymer Brushes // *Front. Chem.* 2019. V. 7. P. 101.
8. Giannakopoulou A., Patila M., Spyrou K., et al. Development of a Four-Enzyme Magnetic Nanobiocatalyst for Multi-Step Cascade Reactions // *Catalysts*. 2019. V. 9. № 12. P. 995.
9. Ronzhin N., Baron A., Puzyr A., et al. Modified Nanodiamonds as a New Carrier for Developing Reusable Enzymatic Test-systems for Determination of Physiologically Important Substances // *Modern Clinical Medicine Research*. 2018. V. 2. P. 7–17.
10. Mogilnaya O., Ronzhin N., Artemenko K., et al. Nanodiamonds as an Effective Adsorbent for Immobilization of Extracellular Peroxidases from Luminous Fungus *Neonothopanus nambi* to Construct a Phenol Detection System // *Biocatal. Biotransform.* 2019. V. 37. P. 97–105.
11. Ронжин Н.О., Могильная О.А., Артеменко К.С., и др. Экстраклеточные оксидазы базидиомицета *Neonothopanus nambi*: выделение и некоторые свойства // Доклады РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 490. № 1. С. 49–54.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
13. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа; 1981.
14. Бондарь В.С., Пузырь А.П. Наноалмазы для биологических исследований // *Физика твердого тела*. 2004. Т. 46. № 4. С. 698–701.
15. Ronzhin N., Puzyr A., Bondar V. Detonation Nanodiamonds as a New Tool for Phenol Detection in Aqueous Medium // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2018. V. 18. P. 5448–5453.

REUSABLE SYSTEM FOR PHENOL DETECTION IN AN AQUEOUS MEDIUM BASED ON NANODIAMONDS AND EXTRACELLULAR OXIDASE FROM BASIDIOMYCETE *Neonothopanus nambi*

N. O. Ronzhin^{a, #}, O. A. Mogilnaya^a, E. D. Posokhina^a, and V. S. Bondar^a

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

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

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendji

A reusable system for phenol determination in an aqueous medium was obtained by adsorption of extracellular oxidase from fungus *Neonothopanus nambi* onto modified nanodiamonds (MND) synthesized by detonation. It was found that the enzyme strongly binds to MND and exhibits catalytic activity in the reaction of co-oxidation of phenol with 4-aminoantipyrine without the addition of hydrogen peroxide. In the presence of the MND–oxidase complex, a significantly (by an order of magnitude) higher yield of the reaction product is recorded as compared to the yield in the presence of a free enzyme; the mechanism of the revealed effect is discussed. Model experiments have demonstrated the multiple use of the MND–oxidase complex for testing phenol in aqueous samples. The immobilized enzyme exhibits functional activity during long-term (2 months) storage of the MND–oxidase complex at 4°C. The data obtained create the prerequisites for using the created system in environmental monitoring of water pollution with phenol.

Keywords: nanodiamond, extracellular oxidase, basidiomycete *Neonothopanus nambi*, indication system, phenol

УДК 575.22:595.773.4

МУТАЦИИ САЙТОВ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В БЕЛКЕ MSL1 НЕ ВЛИЯЮТ НА ДОЗОВУЮ КОМПЕНСАЦИЮ У *Drosophila melanogaster*

© 2021 г. В. А. Бабоша¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹, О. Г. Максименко^{1,*}

Поступило 17.03.2021 г.
После доработки 03.04.2021 г.
Принято к публикации 05.04.2021 г.

Белки MSL1 и MSL2 формируют основу комплекса дозовой компенсации дрозофилы, который специфично связывается с X-хромосомой самцов. Ранее было показано, что фосфорилирование определенных аминокислотных остатков регулирует активность MSL1. В настоящем исследовании были получены трансгенные линии дрозофил, экспрессирующие мутантные варианты белка MSL1, в которых были заменены аминокислоты, подвергающиеся фосфорилированию. В результате показано, что инактивация сайтов фосфорилирования не влияет на эффективность специфичного связывания комплекса дозовой компенсации с X-хромосомой самцов и его функциональную активность.

Ключевые слова: дозовая компенсация, дрозофила, MSL1, политенные хромосомы, регуляция транскрипции, фосфорилирование

DOI: 10.31857/S2686738921040041

Механизм дозовой компенсации у дрозофилы осуществляется посредством увеличения уровня экспрессии генов X-хромосомы самца (X/Y) в два раза по сравнению с самками (X/X). За увеличение экспрессии генов X-хромосомы самцов отвечает мультисубъединичный комплекс дозовой компенсации (КДК), состоящий из пяти белков, MSL1, MSL2, MSL3, MOF и MLE, и двух некодирующих РНК – гоX1 (3.7 т.п.н.) и гоX2 (0.6 т.п.н.), выполняющих сходные функции [1, 2]. Белки MSL1 и MSL2 создают структурную основу КДК. На N-конце MSL1 находится домен (рис. 1а), формирующий гомодимер, который взаимодействует с двумя молекулами белка MSL2 [3]. С-концевой РЕНЕ-домен белка MSL1 [4] отвечает за взаимодействие с белками MSL3 и MOF (рис. 1а). Белок MOF является основной ацетилтрансферазой, обеспечивающей ацетилирование по лизину в 16 положении гистона H4 [5], которое коррелирует с усилением транскрипции генов.

Белки MSL1, MSL3, MOF и MLE присутствуют также у самок и участвуют в регуляции экспрессии генов по независимому от дозовой компенсации механизму [6]. Белок MSL1 участвует совместно с MOF в формировании альтернативных комплексов, которые связываются с промоторами генов вне зависимости от дозовой компенсации [7]. Было показано, что MSL1 непосредственно функционально взаимодействует с киназой CDK7, которая регулирует активность промоторов генов [8]. При этом фосфорилирование MSL1 регулирует его активность и локализацию на хроматине.

Целью данной работы было исследование роли фосфорилирования MSL1 для правильной локализации комплекса дозовой компенсации на X-хромосоме самцов. Согласно предыдущему исследованию [8], фосфорилирование белка MSL1 в основном происходит по серину 18 и треонинам в позициях 741, 747 и 751 (рис. 1а). Для исследования функциональной роли фосфорилирования MSL1 нами были получены две мутантные производные, в одной из которых был заменен серин (18) на аланин (MSL1^{S/A}, S18A), а в другой – треонины в положениях 741, 747 и 751 на аланины (MSL1^{T/A}, T743A, T747A и T751A).

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

*e-mail: maksog@mail.ru

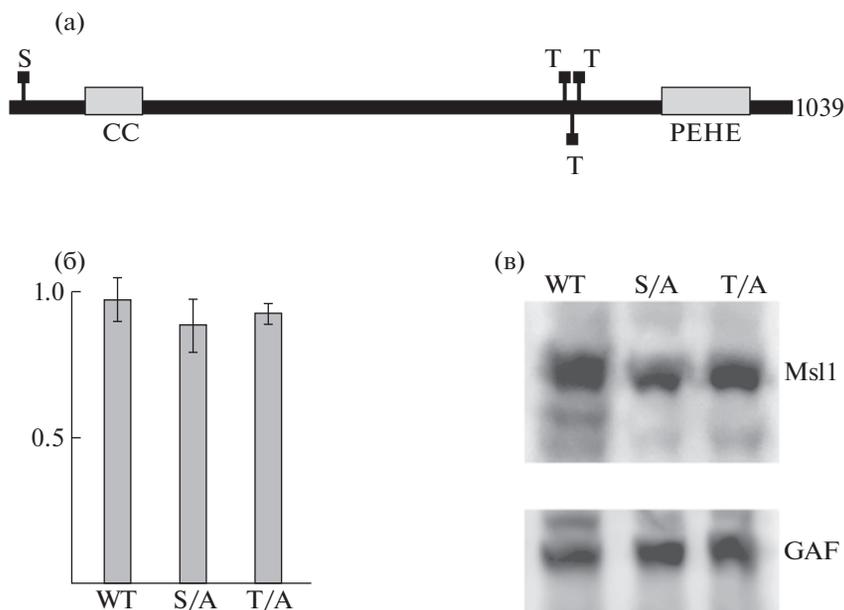


Рис. 1. (а) Схема белка MSL1. Отмечены остатки серина и треонина, которые были заменены на аланины. (б) Гистограмма, демонстрирующая уровень выживаемости самцов полученных трансгенных линий относительно самок. (в) Результаты иммуноблот-анализа белковых экстрактов, выделенных из полученных трансгенных конструкций. WT — мухи дикого типа. S/A и T/A — мухи, экспрессирующие мутантные варианты белка MSL1 под убиквитиновым промотором. Окраска антителами к белкам Msl1 и GAF.

Для экспрессии мутантных белков в трансгенных линиях дрозофилы кДНК мутантных вариантов MSL1 были встроены в вектор с убиквитиновым (Ubi) промотором, который был ранее успешно использован для экспрессии белка MSL2 [9]. Для получения сравнимых результатов конструкции были интегрированы в геном дрозофилы с помощью фС31-опосредованной рекомбинации по attP-сайту, расположенному в цитогенетическом локусе 86F 3-й хромосомы [10]. Ранее была охарактеризована нуль-мутация в гене *msl1*, *msl1^{I185}*, которая приводит к гибели самцов, но не влияет на выживаемость самок [11]. С помощью генетических скрещиваний с использованием балансеров СуО и ТМ6, Ну были получены синтетические трансгенные линии, в которых трансгены MSL1^{S/A}(86Fb) или MSL1^{T/A}(86Fb) находились в комбинации с гомозиготной нуль-мутацией *msl1^{I185}*. Данные линии были созданы для того, чтобы понять, способен ли мутантный белок, в котором нарушены сайты фосфорилирования, компенсировать нуль-мутацию. Неожиданно оказалось, что экспрессия мутантных белков MSL1 полностью компенсирует отсутствие эндогенного белка MSL1: в обоих синтетических линиях самцы и самки имели сравнимую выживаемость, что предполагает восстановление функции дозовой компенсации (рис. 1б). При этом, согласно результатам иммуноблот-анализа, экс-

прессия мутантных MSL1 в самцах из синтетических линий находится на сравнимом уровне с самцами из линии дикого типа (рис. 1в). Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что инактивация сайтов фосфорилирования в белке MSL1 не влияет на его функциональную активность в дозовой компенсации.

Наиболее хорошо специфичное связывание комплекса дозовой компенсации с X-хромосомой самцов можно наблюдать на политенных хромосомах из слюнных желез личинок [12]. Нами было проведено исследование связывания белков MSL1 и MSL2 с политенными хромосомами линии дикого типа и синтетических линий MSL1^{S/A}(86Fb) и MSL1^{T/A}(86Fb) (рис. 2). В исследовании были использованы антитела к белкам MSL1 и MSL2, полученные в кроликах [9]. Как и ожидалось, только X-хромосома самцов линии дикого типа покрыта участками связывания белков MSL1 и MSL2 (рис. 2а). В самцах дикого типа окрашивание X-хромосомы антителами к белкам MSL1 и MSL2 не наблюдалось (рис. 2б). Таким образом, полученные результаты демонстрируют правильность профиля узнавания антител к MSL-белкам. В синтетических линиях MSL1^{S/A}(86Fb) и MSL1^{T/A}(86Fb) паттерн распределения участков связывания белков MSL1 и MSL2 на политенных хромосомах не отличается от контрольной линии самцов дикого типа

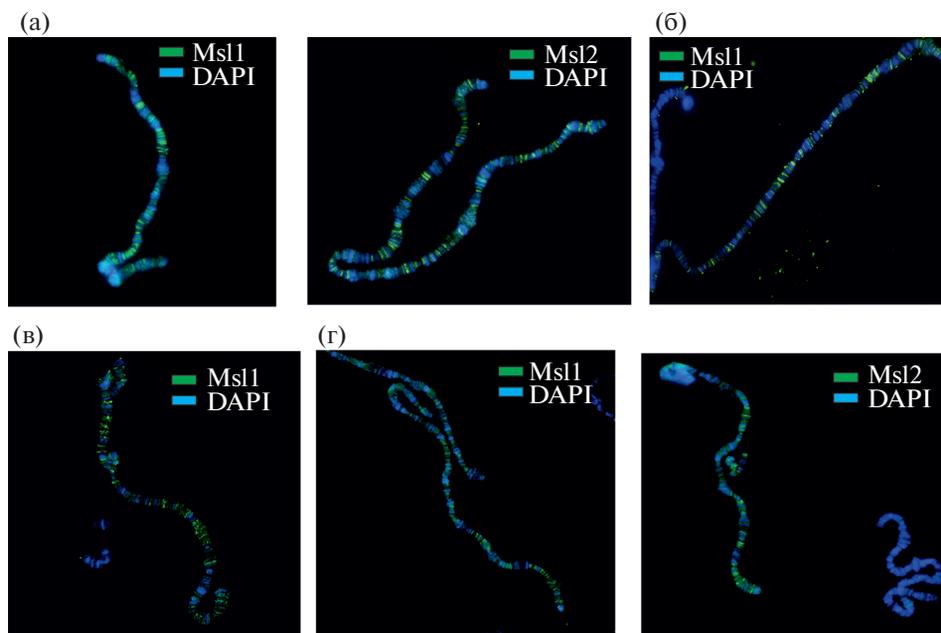


Рис. 2. Исследование связывания КДК с политенными хромосомами в различных линиях дрозофил: (а) самцы (MSL1 и MSL2) и (б) самки (MSL1) дикого типа, линии с экспрессией мутантных вариантов (в) MSL1^{S/A} и (г) MSL1^{T/A}. Окраска антителами к MSL1 и MSL2.

(рис. 2в, г). Таким образом, мутации, инактивирующие сайты фосфорилирования в белке MSL1, не влияют на эффективность специфического связывания комплекса дозовой компенсации с X-хромосомой самцов.

Полученные нами результаты не согласуются с предыдущим исследованием, в котором было показано, что мутация сайтов фосфорилирования MSL1 приводит к нарушению связывания комплекса дозовой компенсации с X-хромосомой и летальности самцов [8]. Основным отличием в работе [8] являлось использование индуцируемой системы UAS/GAL4 для экспрессии мутантных вариантов MSL1 на фоне нуль-мутации по *msl1*. При этом для индукции экспрессии UAS-промотора была использована линия, содержащая GAL4-драйвер под контролем сильного тубулинового промотора (*tub-Gal4*). Вероятно, избыточная суперэкспрессия мутантных вариантов белка MSL1 приводила к снижению эффективности связывания комплекса дозовой компенсации с X-хромосомой самцов. Механизм этого явления требует дальнейшего исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда, грант № 17-74-20155.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuroda M.I., Hilfiker A., Lucchesi J.C. // *Genetics*. 2016. V. 204. P. 435–450.
2. Samata M., Akhtar A. // *Annu. Rev. Biochem.* 2018. V. 87. P. 323–350.
3. Hallacli E., Lipp M., Georgiev P., et al. // *Mol. Cell*. 2012. V. 48. P. 587–600.
4. Kadlec J., Hallacli E., Lipp M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 142–149.
5. Prestel M., Feller C., Straub T., et al. // *Mol. Cell*. 2010. V. 38. P. 815–826.
6. Conrad T., Akhtar A. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. P. 123–134.
7. Straub T., Zabel A., Gilfillan G.D., et al. // *Genome Res.* 2013. V. 23. P. 473–485.
8. Chlamydas S., Holz H., Samata M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. V. 23. P. 580–589.
9. Tikhonova E., Fedotova A., Bonchuk A., et al. // *Development*. 2019. V. 146 P. dev 179663
10. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007. V. 104. P. 3312–3317.
11. Palmer M.J., Mergner V.A., Richman R., et al. // *Genetics*. 1993. V. 134. P. 545–557.
12. Demakova O.V., Kotlikova I.V., Gordadze P.R., et al. // *Chromosoma*. 2003. V. 12. P. 103–115.

MUTATIONS OF PHOSPHORYLATION SITES IN MSL1 PROTEIN DO NOT AFFECT DOSAGE COMPENSATION IN *Drosophila melanogaster*

V. A. Babosha^a, Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and O. G. Maksimenko^{a,#}

^a *Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation*

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

Proteins MSL1 and MSL2 form the core of the *Drosophila* dosage compensation complex, which specifically binds to the X chromosome of males. Phosphorylation of certain amino acid residues has been previously shown to regulate MSL1 activity. In the present work, transgenic lines of *Drosophila* were obtained, expressing mutant variants of the MSL1 protein, in which amino acids undergoing phosphorylation were replaced. As a result, it was shown that inactivation of phosphorylation sites does not affect the efficiency of specific binding of the dosage compensation complex to the X chromosome of males and its functional activity.

Keywords: Dosage compensation, *Drosophila*, MSL1, polytene chromosomes, transcription regulation, phosphorylation

УДК 581.1

ЭКЗОГЕННЫЙ МЕЛАТОНИН СНИЖАЕТ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКОГО СТРЕССА НА РАСТЕНИЯ ЯЧМЕНЯ

© 2021 г. Е. Д. Данилова^{1,*}, И. Е. Злобин², член-корреспондент РАН В. В. Кузнецов^{1,2}, М. В. Ефимова¹

Поступило 09.03.2021 г.

После доработки 05.04.2021 г.

Принято к публикации 05.04.2021 г.

Исследовали влияние мелатонина на ростовые параметры, фотохимическую активность фотосистемы II, содержание основных фотосинтетических пигментов и перекисное окисление липидов в листьях растений ячменя в условиях полиметаллического стресса. Впервые установили, что защитное действие фитомелатонина проявляется в снижении токсического действия полиметаллов на аккумуляцию биомассы, рост корневой системы и размер ассимилирующей поверхности. В основе протекторного действия гормона лежит его способность снижать интенсивность окислительного стресса за счет поддержания уровня каротиноидов и повышения активности супероксиддисмутазы, но не за счет регуляции фотохимической активности хлоропластов. Эффективность применения мелатонина не зависит от длительности его воздействия. Полученные данные могут служить основой для оптимизации технологий применения мелатонина, в качестве вещества индуцирующего состояние прайминга растений.

Ключевые слова: мелатонин, *Hordeum vulgare*, полиметаллическое загрязнение, фотосинтетические пигменты, фотосистема II, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутазы, прайминг

DOI: 10.31857/S2686738921040077

В настоящее время огромные территории загрязнены солями тяжелых металлов [1], что приводит к снижению продуктивности растений и создает риски попадания токсичных элементов в пищевую цепь человека [2]. Повышенное содержание подвижных форм кадмия, никеля, цинка и других тяжелых металлов присуще кислым почвам, на которые приходится более трети всех пахотных угодий [1, 3]. Закисление почв является результатом индустриальной деятельности, а также чрезмерного использования удобрений, пестицидов и сточных вод для орошения возделываемых земель [1, 3].

Принятые в настоящее время технологии снижения кислотности почв и доступности ионов тяжелых металлов для растений могут оказывать негативное влияние на окружающую среду [3]. Применение соединений гормональной природы для повышения продуктивности растений в условиях техногенного стресса является эффективной

и безопасной технологией [2, 4]. Особый интерес представляет фитомелатонин, который представляет собой индоламин (N-ацетил-5-метокси-триптамин). Фитомелатонин способен увеличивать устойчивость растений к действию различных стрессоров, прежде всего, за счет повышения антиоксидантного статуса организма [5–7] и индукции прайминга, т.е. способности повышать устойчивость растений к отсроченному действию повреждающего фактора в результате кратковременной обработки растений мелатонином [4, 8]. Кроме того, известно, что мелатонин снижает токсическое действие меди и кадмия на растениях рапса и редиса соответственно [9, 10], повышает устойчивость арбуза к высоким концентрациям ванадия [11] и активирует антиоксидантную систему *Medicago truncatula* на фоне действия свинца [12]. Однако в естественной среде растения, как правило, сталкиваются с умеренным повышением уровня доступности в почве одновременно целого ряда тяжелых металлов [13, 14], что делает приоритетной задачей изучение реакции растения именно на полиметаллический стресс. Между тем, защитный эффект мелатонина при действии на растения полиметаллического стресса остается в настоящее время открытым.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы выяснить, снижает ли мелатонин токсичность

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: nusy.l.d@gmail.com

совместного действия ряда тяжелых металлов на растения ячменя и каковы возможные защитные механизмы данного явления.

Исследования проводили на растениях ячменя (*Hordeum vulgare*) в условиях, максимально приближенных к условиям произрастания растений в агроценозах и на загрязненных тяжелыми металлами природных территориях. Растения выращивали в грунте с добавлением перлита в течение пяти суток при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом. Далее в течение 7 сут растения адаптировали к условиям жидкой питательной среды по Blamey (рН 4.5) [13] с низким содержанием фосфора – 5 мкМ [15]. Такая питательная среда лучше соответствовала реальному составу почвенного раствора на кислых почвах по сравнению с традиционно используемыми питательными средами, где из-за высоких значений рН раствора и высоких концентраций фосфат-ионов доступность ионов металлов для растений (а значит, и их токсический эффект) значительно снижена [13]. Далее часть растений переносили на ту же питательную среду по Blamey на 6 сут (контроль, вариант 1) или на среду с мелатонином (10 мкМ, вариант 2); другие растения (вариант 3) подвергали полиметаллическому стрессу: Al^{3+} (20 мкМ); Mn^{2+} (50 мкМ); Cd^{2+} (2,8 мкМ); Cu^{2+} (2 мкМ); Ni^{2+} (16 мкМ); Zn^{2+} (40 мкМ); Pb^{2+} (0,30 мкМ); следующую группу растений (вариант 4) подвергали прикорневой обработке мелатонином (10 мкМ, 1 сут) с последующим полиметаллическим стрессом (6 сут) (прайминг мелатонином); остальные растения (вариант 5) выращивали в течение 6 сут при одновременном действии мелатонина (10 мкМ) и тяжелых металлов. Концентрации используемых тяжелых металлов (Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+}) и алюминия (Al^{3+}) подбирали на основании типичных значений концентраций этих ионов в почвенном растворе промышленно загрязненных кислых почв [13, 14]. Через 6 сут после начала эксперимента измеряли ростовые и морфологические характеристики, включая аккумуляцию биомассы, максимальную длину корня, содержание фотосинтетических пигментов и параметры фотохимической активности фотосистемы II (ФС II); растительный материал для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) и оценки уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) фиксировали жидким азотом и хранили при -70°C .

Параметры фотохимической активности ФС II измеряли с помощью РАМ флуориметра (MINI-PAM-II, Heinz-Walz, Germany). Максимальный (F_v/F_m) и эффективный ($Y(II)$) квантовые выходы ФС II, квантовые выходы нерегулируемой ($Y(\text{NO})$) и регулируемой ($Y(\text{NPQ})$) диссипации энергии рассчитывали с использованием программного обеспечения MINI-PAM-II. Со-

держание основных фотосинтетических пигментов измеряли согласно Лихтенгаллеру [16], интенсивность ПОЛ оценивали спектрофотометрическим методом, основанным на образовании окрашенного комплекса – продукта малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при нагревании [17]. Определение активности СОД проводили по методу Beauchamp и Fridovich [18]. Эксперименты проводили в трех биологических повторностях; использовали не менее 90 растений на каждый вариант опыта. Полученные результаты представлены в таблицах и на рисунке в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения t -критерия находили для 95% уровня значимости ($p < 0.05$).

Токсическое действие ионов металлов на растениях ячменя проявлялось в ингибировании накопления биомассы, торможении роста корней и уменьшении площади листовой поверхности на 26, 38 и 23% соответственно (табл. 1, рис. 1). Мелатонин, на фоне полиметаллов, значительно снижал токсическое действие стресса на ростовые процессы; наиболее эффективным было кратковременное воздействие мелатонина на растения (табл. 1, рис. 1).

Способность поддерживать высокий уровень фотосинтетических пигментов является важным показателем физиологического состояния растения в условиях стресса. Из полученных данных следует, что избыточное содержание тяжелых металлов и алюминия в питательном растворе вызывало снижение уровня хлорофиллов и каротиноидов (на 18–21%) по сравнению с их содержанием в растениях контрольного варианта (табл. 2). Предобработка растений мелатонином или его внесение в питательный раствор одновременно с полиметаллами сопровождалось снижением их токсического действия на содержание пигментов.

Использование мелатонина (6 сут, 10 мкМ) на фоне полиметаллического воздействия повышало содержание хлорофиллов и каротиноидов относительно стрессовых условий на 24–27%, тогда как эффективность кратковременного воздействия мелатонина при последующем полиметаллическом загрязнении была ниже и составляла 16–18% (табл. 2). Следует отметить, что именно каротиноиды, являющиеся неферментативными компонентами антиоксидантной системы, участвуют в тушении активных форм кислорода (АФК) и снижении интенсивности окислительного стресса [19]. На этом основании можно предположить, что поддержание уровня каротиноидов в растениях ячменя при полиметаллическом стрес-

Таблица 1. Влияние мелатонина на ростовые показатели растений ячменя в условиях полиметаллического стресса (ПМ)

	Суммарная площадь листовой поверхности, см ²	Длина корня, см	Сырая масса всего растения, г
Контроль	12.48 ± 0.21	11.68 ± 0.28	0.96 ± 0.03
Мелатонин (6 сут)	13.10 ± 0.24	13.24 ± 0.19*	1.07 ± 0.09
% от контрольного значения	105	113	111
ПМ (6 сут)	9.59 ± 0.17*	7.24 ± 0.31*	0.71 ± 0.02*
% от контрольного значения	77	62	74
Мелатонин (1 сут) + ПМ (6 сут)	11.87 ± 0.14*. [#]	11.18 ± 0.32 [#]	0.87 ± 0.02 [#]
% от контрольного значения	95	96	91
Мелатонин (6 сут) + ПМ (6 сут)	12.16 ± 0.13 [#]	12.74 ± 0.36 [#]	0.84 ± 0.02 [#]
% от контрольного значения	97	97	87

Примечание. * $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением; [#] $p < 0.05$ при сравнении с ПМ.

се является одной из регулируемых мелатонином защитных реакций.

Для выявления действия тяжелых металлов, алюминия и экзогенного мелатонина на фотосинтетическую функцию листьев ячменя оценива-

ли параметры фотохимической активности ФС II. Значение максимальной квантовой эффективности (F_v/F_m) отражает потенциальный квантовый выход ФС II и является чувствительным индикатором функционального состояния фотосинте-

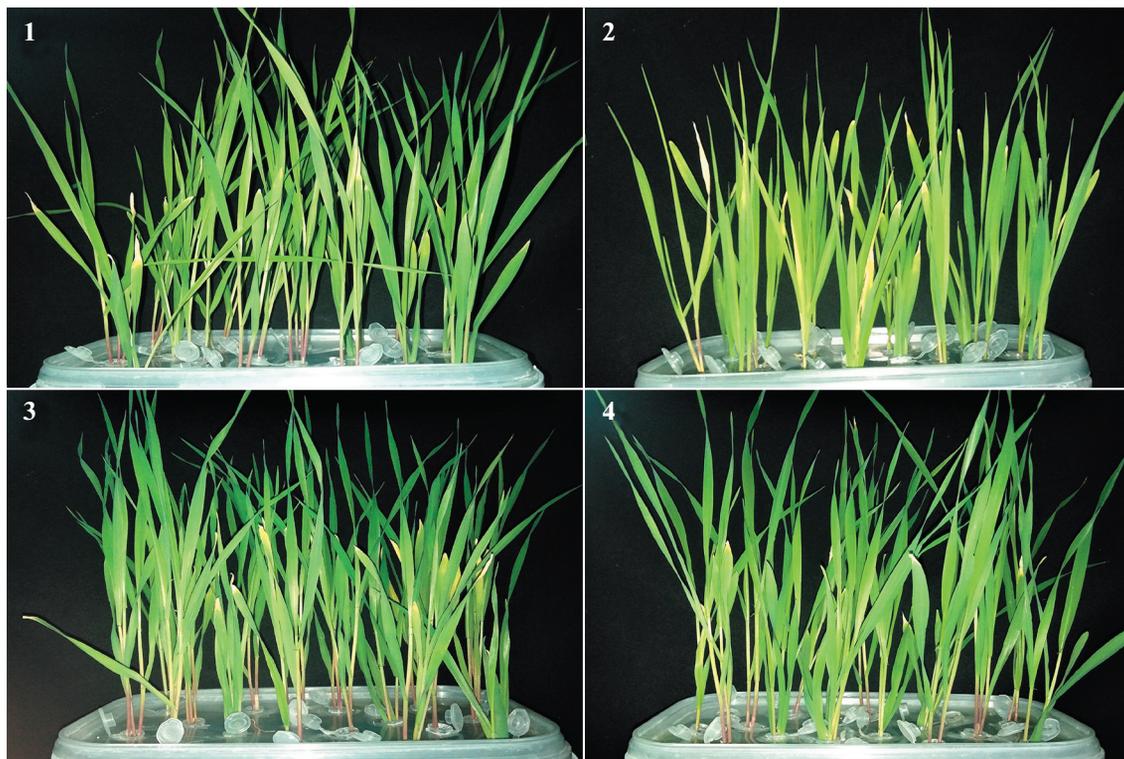


Рис. 1. Влияние кратковременной (1 сут) и длительной (6 сут) обработки мелатонином растений ячменя на фоне действия полиметаллов и алюминия.

1 – контрольный вариант, 2 – полиметаллический стресс (6 сут), 3 – 1 сут предобработки растений мелатонином с последующим действием полиметаллов (6 сут), 4 – одновременное влияние мелатонина и полиметаллического стресса (6 сут).

Таблица 2. Влияние мелатонина (10 мкМ) на состояние фотосинтетического аппарата листьев ячменя на фоне полиметаллического стресса (ПМ)

	Содержание фотосинтетических пигментов, мг/г сырой массы			Параметры фотосинтетической активности ФСII			
	Хф <i>a</i>	Хф <i>b</i>	Каротиноиды	F_v/F_m	Y(II)	Y(NO)	Y(NPQ)
Контроль	0.524 ± ± 0.029	0.139 ± ± 0.015	0.151 ± ± 0.013	0.804 ± ± 0.014	0.702 ± ± 0.023	0.204 ± ± 0.021	0.104 ± ± 0.011
Мелатонин (6 сут)	0.562 ± ± 0.034	0.152 ± ± 0.019	0.162 ± ± 0.019	0.796 ± ± 0.009	0.705 ± ± 0.017	0.207 ± ± 0.015	0.101 ± ± 0.012
% от контрольного значения	107	109	107	99	100	101	97
ПМ (6 сут)	0.414 ± ± 0.027*	0.113 ± ± 0.014	0.124 ± ± 0.008	0.773 ± ± 0.013	0.681 ± ± 0.012	0.231 ± ± 0.013	0.092 ± ± 0.012
% от контрольного значения	79	82	82	96	97	113	88
Мелатонин (1 сут) + ПМ (6 сут)	0.475 ± ± 0.058	0.131 ± ± 0.017	0.136 ± ± 0.012	0.793 ± ± 0.023	0.693 ± ± 0.013	0.214 ± ± 0.021	0.092 ± ± 0.013
% от контрольного значения	91	94	90	99	99	105	88
Мелатонин (6 сут) + ПМ (6 сут)	0.507 ± ± 0.024#	0.143 ± ± 0.012	0.152 ± ± 0.009#	0.784 ± ± 0.011	0.692 ± ± 0.021	0.213 ± ± 0.014	0.091 ± ± 0.014
% от контрольного значения	97	103	101	98	99	104	88

Примечание. * $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $p < 0.05$ при сравнении с ПМ.

тической системы. Полученные данные свидетельствуют о том, что F_v/F_m листьев контрольных растений составляла 0.804 (табл. 2), что соответствует величинам данного показателя, характерным для растений, не подвергнутым стрессорным воздействиям [7]. Ионы тяжелых металлов и алюминия несколько снижали максимальный квантовый выход флуоресценции ФС II (F_v/F_m) до 0.773, тогда как мелатонин частично восстанавливал значения F_v/F_m (табл. 2).

Из представленных данных видно, что эффективность фотохимических реакций ФС II, характеризующаяся величиной эффективного квантового выхода (Y(II)), и квантовый выход нефотосинтетической регулируемой диссипации энергии (Y(NPQ)) в присутствии полиметаллов в среде незначительно понижались относительно контрольных растений, тогда как квантовый выход нерегулируемой диссипации энергии (Y(NO)) несколько возрастал (табл. 2). Различная по продолжительности прикорневая обработка растений мелатонином на фоне полиметаллического воздействия оказывала некоторый защитный эффект на фотохимическую активность ФС II, достоверность которого, тем не менее, не была доказана.

Избыточные концентрации тяжелых металлов активируют генерацию АФК, одним из проявлений которой является перекисное окисление липидов. Критерием оценки ПОЛ является содержание малонового диальдегида в реакции с тио-

барбитуровой кислотой. Полученные данные показали, что полиметаллический стресс увеличивал уровень МДА на 52–74% по отношению к контролю (табл. 3). На фоне стресса мелатонин частично снижал интенсивность ПОЛ [20]. Наиболее эффективной была кратковременная предобработка растений мелатонином, при которой уровень ПОЛ в листе и стебле снижался на 14% по сравнению с техногенным стрессом (табл. 3).

Для снижения негативного влияния окислительного стресса, вызываемого тяжелыми металлами, растения используют систему детоксикации АФК, важным компонентом которой является фермент супероксиддисмутаза. В ответ на присутствие в среде ионов тяжелых металлов и алюминия растения отвечали увеличением активности СОД на 78% относительно контрольных значений (рис. 2). Прайминг растений мелатонином был эффективнее длительного воздействия гормона и способствовал повышению активности СОД по сравнению с действием одного полиметаллического стресса на 22% (рис. 2).

Таким образом, нами впервые получены данные о протекторной роли мелатонина в растениях ячменя на фоне совместного действия ионов ряда тяжелых металлов и алюминия (Al^{3+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+}). Защитный эффект мелатонина проявлялся на уровне аккумуляции биомассы, роста корневой системы, поддержания площади ассимилирующей поверхности и содержания основных фотосинтетических пигментов,

Таблица 3. Влияние кратковременной и длительной обработки мелатонином (10 мкМ) на величину перекисного окисления липидов на фоне полиметаллического стресса (ПМ)

	Содержание МДА, нМ/г сырой массы		
	Лист	Стебель	Корень
Контроль	39.14 ± 3.81	117.47 ± 7.13	63.87 ± 4.53
Мелатонин (6 сут)	35.42 ± 2.49	128.12 ± 5.94	70.32 ± 6.11
% от контрольного значения	91	109	110
ПМ (6 сут)	62.57 ± 5.38*	203.86 ± 9.72*	97.04 ± 5.74*
% от контрольного значения	160	174	152
Мелатонин (1 сут) + ПМ (6 сут)	55.01 ± 4.60	175.06 ± 10.16*	94.06 ± 8.73*
% от контрольного значения	141	149	147
Мелатонин (6 сут) + ПМ (6 сут)	61.50 ± 4.50*	176.78 ± 8.12*	97.33 ± 3.17*
% от контрольного значения	157	150	152

Примечание: * $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $p < 0.05$ при сравнении с ПМ.

но не фотохимической активности ФС II, которая оказалась достаточно устойчивой к полиметаллическому стрессу. Степень наблюдаемого протекторного эффекта мелатонина не зависела от длительности гормональной обработки. В основе положительного влияния мелатонина, очевидно, лежит его способность активировать клеточную антиоксидантную систему, о чем свидетельствуют рост активности СОД при кратковременном прайминге растений мелатонином и поддержание уровня каротиноидов в условиях длительного стресса. Способность мелатонина вызывать состояние прайминга на фоне действия тяжелых металлов может быть использована для разработки эффективных технологий

защиты растений в условиях техногенного стресса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90051.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Srivastava V., Sarkar A., Singh S., et al.* // *Frontiers in Environmental Science*. 2017. V. 5. № 64.
2. *Bucker-Neto L., Paiva A.L., Machado R.D., et al.* // *Genet. Mol. Biol.* 2017. V. 40 (1). P. 373–386.
3. *Bian M., Zhou M., Sun D., et al.* // *The Crop Journal*. 2013. V. 1. № 2. P. 91–104.
4. *Efimova M.V., Khripach V.A., Boyko E.V., et al.* // *Doklady Biological Sciences*. 2018. V. 478. № 1. P. 33–36.
5. *Arnao M.B., Marino B., Hernandez-Ruiz J.* // *Trends in Plant Science*. 2019. V. 24. P. 38–48.
6. *Moustafa-Farag M., Elkesh A., Dafea M., et al.* // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 5359.
7. *Danilova E.D., Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., et al.* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2020. V. 495. P. 271–275.
8. *Kolomeichuk L.V., Danilova E.D., Khripach V.A., et al.* // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2021. V. 68. № 3. P. 297–307.
9. *Kholodova V.P., Vasil'ev S.V., Efimova M.V., et al.* // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018. V. 65. P. 882–889.
10. *Xu L., Zhang F., Tang M., et al.* // *Journal of Pineal Research*. 2020. V. 69. № 1. № 12659.
11. *Nawaz A., Jiao Y., Chen Ch., et al.* // *Journal of Plant Physiology*. 2018. V. 220. P. 115–127.
12. *Zhang X., Zhang H., Zhang H., et al.* // *Frontiers in Microbiology*. 2020. V. 11. № 516.

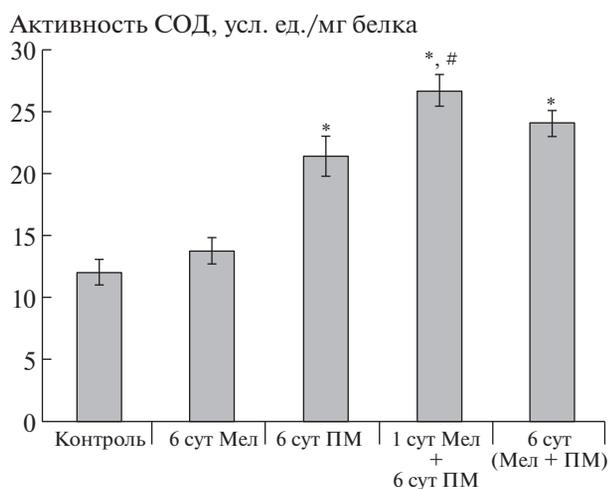


Рис. 2. Влияние мелатонина на активность СОД в листьях растений ячменя на фоне полиметаллического стресса.

Примечание: * $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением; # $p < 0.05$ при сравнении с ПМ.

13. Li Z., Wang P., Menzies N.W., et al. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018. V. 147. P. 872–880.
14. Kopittke P.M., Blamey F.P.C., Asher C.J., et al. // *Journal of Experimental Botany*. 2010. V. 61. P. 945–954.
15. Blamey F.P.C., Hernandez-Soriano M.C., Cheng M., et al. // *Plant Physiology*. 2015. V. 169. № 3. P. 2006–2020.
16. Lichtenthaler H.K. // *Methods Enzymology*. 1987. V. 148. P. 350–382.
17. Buege J.A., Aust S.D. // *Methods Enzymology*. 1978. V. 52. P. 302–310.
18. Beauchamp C., Fridovich I. // *Analytical Biochemistry*. 1971. V. 44. P. 276–287.
19. Stahl W., Sies H. // *Molecular Aspects of Medicine*. 2003. V. 24. № 6. P. 345–351.
20. Boyko E.V., Golovatskaya I.F., Bender O.G., et al. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2020. V. 67. P. 351–359.

EXOGENIC MELATONIN REDUCES THE TOXIC EFFECT OF POLYMETALLIC STRESS ON BARLEY PLANTS

E. D. Danilova^{a,#}, I. E. Zlobin^b, Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov^{a,b} and , and M. V. Efimova^a

^a National research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

^b Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: nusy.l.d@gmail.com

The effect of melatonin on growth parameters, the photochemical activity of photosystem II (PS II), the content of the main photosynthetic pigments, and lipid peroxidation in barley plant leaves under polymetallic stress were studied. Melatonin reduces the toxic effect of polymetals on biomass accumulation, root growth and maintenance of the assimilating surface. The hormone protective action is based on its ability to reduce the intensity of oxidative stress by maintaining the level of carotenoids and increasing the activity of superoxide dismutase, but not by regulating the photochemical activity of chloroplasts. The effectiveness of melatonin is independent of the duration of exposure. The data obtained can be the basis for optimizing the use of melatonin as a plant priming inducing substance.

Keywords: melatonin, *Hordeum vulgare*, polymetallic pollution, photosynthetic pigments, photosystem II, lipid peroxidation, superoxide dismutase, priming

УДК 581.1

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ СТРЕССОВЫЙ БЕЛОК GRUSP ВОВЛЕЧЕН В ГИББЕРЕЛЛИН-ЗАВИСИМУЮ ИНДУКЦИЮ ЦВЕТЕНИЯ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana*

© 2021 г. Д. С. Горшкова^{1,2}, И. А. Гетман¹, Л. И. Сергеева^{1,3},
член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов^{1,2}, Е. С. Пожидаева^{1,*}

Поступило 23.12.2020 г.
После доработки 05.04.2021 г.
Принято к публикации 08.04.2021 г.

Исследовано влияние инсерции Т-ДНК в 3'-UTR область гена *At3g58450 Arabidopsis thaliana*, кодирующего универсальный стрессовый белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein). Установлено, что данная мутация замедляет переход трансгенной линии *grusp-115* к цветению на длинном дне из-за сниженного содержания эндогенных биоактивных гиббереллинов ГК1 и ГК3 по сравнению с растениями дикого типа Col-0. Экзогенные ГК ускоряли цветение растений обеих линий, однако не изменяли временную разницу наступления цветения между Col-0 и *grusp-115*. Помимо изменений в метаболизме ГК, у *grusp-115*, очевидно, имеются нарушения процессов реализации сигнала, индуцирующего цветение. Это подтверждается результатами экспрессии генов флорального интегратора *FLOWERING LOCUS T (FT)* и флорального репрессора *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, являющихся ключевыми регуляторами цветения и действующими разнонаправленно. Мы предполагаем, что на формирование фенотипа *grusp-115* также может влиять низкий уровень экспрессии *FT*, обусловленный повышенной экспрессией *FLC*.

Ключевые слова: цветение, фитогормоны, универсальный стрессовый белок, *At3g58450*, GRUSP

DOI: 10.31857/S2686738921040119

Переход к репродуктивной фазе является важнейшим этапом в онтогенезе цветковых растений. У растения длинного дня (ДД) *Arabidopsis thaliana* (L.) Neuh ключевыми фитогормонами, контролирующими индукцию цветения, являются гиббереллины (ГК) [1], которые строго необходимы и в условиях короткого дня (КД) [2]. На ДД гиббереллины вовлекаются в индукцию цветения опосредованно через регуляцию экспрессии и функционирования основных флоральных интеграторов фотопериодического пути цветения *FLOWERING LOCUS T (FT)* и *SOC1*. Накопление ГК в листьях приводит к деградации транскрипционных репрессоров группы DELLA и ин-

дуцирует транскрипцию гена FT [3, 4] за счет активации транскрипционных факторов CO и SPL [5]. В апикальной меристеме ГК-зависимая деградация DELLA-белков приводит к активации экспрессии LEAFY и SOC1, что, в свою очередь, обеспечивает переход к цветению [6].

Помимо гиббереллинов, важная роль в зацветании принадлежит абсцизовой кислоте (АБК). В зависимости от условий произрастания и физиологического состояния растения воздействие АБК способно как ускорять, так и задерживать переход от вегетативной стадии онтогенеза к репродуктивной [7]. В основе задержки цветения растений в условиях ДД лежит функционирование АБК-зависимых транскрипционных факторов ABI4 и ABI5 [8, 9]. ABI4 ингибирует переход к цветению, подавляя биосинтез ГК и стимулируя экспрессию флорального репрессора *FLOWERING LOCUS C (FLC)* [8–10]. Дополнительный вклад в активацию FLC вносят DELLA-белки, обеспечивая тем самым тесную взаимосвязь с ГК-зависимыми ответами [11].

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Вагенингенский университет и Исследовательский центр, Вагенинген, Нидерланды

*e-mail: alenapoj@mail.ru

Универсальный стрессовый белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein), кодируемый геном *At3g58450 A. thaliana* [12, 13], является потенциальным участником механизмов, контролирующих баланс между АБК и ГК на разных стадиях развития растения. Экспрессия *At3g58450* значительно возрастает в проростках Col-0, обработанных АБК, а нарушение его транскрипции приводит к АБК-гиперчувствительности трансгенных семян *grusp-115* [12].

Цель данного исследования заключается в том, чтобы впервые изучить взаимосвязь позднецветущего фенотипа трансгенной линии *grusp-115*, характеризующейся пониженной экспрессией гена *At3g58450* из-за вставки Т-ДНК в его 3'-UTR область, с содержанием эндогенных гиббереллинов и экспрессией генов, контролирующих переход растения к репродуктивному развитию.

В исследовании использовали растения дико-го типа *A. thaliana* (L.) Heynh экотипа Columbia (Col-0) и гомозиготной трансгенной линии *GABI_kat 115C08 (grusp-115)* [12]. Растения выращивали в почве в климатической камере с 16-часовым фотопериодом при интенсивности освещения $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и температуре $+21^\circ\text{C}$.

Развитие растений Col-0 и *grusp-115* анализировали в соответствии со шкалой стадий роста, которая используется для идентификации и интерпретации фенотипических различий и определения конкретных стадий роста у *A. thaliana* так, как описано ранее [14]. Индикатором наступления генеративной стадии является появление головки соцветия в розетке растения. Время цветения выражено в количестве дней после стратификации или количестве розеточных листьев на момент появления цветочной почки.

Содержание активных ГК определяли в 10 мг лиофилизированных образцов, полученных из розеточных листьев 4-недельных растений Col-0 и *grusp-115* [15]. Из исследований, основанных на использовании изотопов, известно, что обработка экзогенными ГК приводит к эффективному поглощению ГК листьями и к их последующему транспорту в апексы побегов в биологически активной форме [16]. В связи с чем реакцию растений на экзогенные ГК изучали с использованием 100 мкМ водного раствора ГК4 + 7 ("Sigma", США). Для этого проростки, начиная с возраста 14 дней, дважды в неделю в течение 12 нед опрыскивали раствором ГК в присутствии 0.02% (v/v) Твин-20. Контрольные растения опрыскивали раствором, содержащим только 0.2% (v/v) Твин-20.

Уровни транскриптов генов *FLC (At5g10140)* и *FT (At1g65480)* оценивали методом ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) так, как было описано ранее [13]. Для амплификации фрагментов генов использовали пары праймеров: *FLC* 5'-AAAGTAGCCGACAAGTCACC-3' и 5'-GGATGC-

GTCACAGAGAACAG-3'; *FT* 5'-GCCAGAACTTCAACACTCGC-3' и 5'-AGCCACTCTCCCTCTGACAA-3'. Эксперименты проводили в 3-кратной биологической повторности. Достоверность различий проверяли при помощи критерия Стьюдента (*t*-критерий).

Установлено, что задержка прорастания трансгенных семян *grusp-115* является результатом изменений в экспрессии генов метаболизма ГК, в том числе генов биосинтеза, *GA20ox1* и *GA3ox1* [13]. Снижение интенсивности экспрессии генов биосинтеза ГК также может быть причиной и более длительной стадии вегетативного роста, наблюдаемой у *grusp-115* (рис. 1а).

У Col-0 через 28–30 дней после стратификации сформировалась хорошо видимая головка соцветия, в то время как у *grusp-115* наблюдалась задержка формирования соцветия до 35 дней. Более того, удлинение стебля у Col-0 началось через 3–5 дней после появления цветочной почки, в то время как у *grusp-115* этого не происходило, и головка соцветия дольше сохранялась внутри листьев розетки (рис. 1б; номер 2 – растения 35-дневного возраста). Полноразмерные побеги с цветками и стручками сформировались у 45-дневных растений Col-0, в то время как *grusp-115* в этом возрасте находился на стадии удлинения побега и раскрытия первых цветочных почек (рис. 1б, номер 3–45-дневные растения). Таким образом, временная разница между Col-0 и *grusp-115* составила 10 дней с момента образования соцветия и удлинения побега. Впоследствии *grusp-115* сформировал полукарликовый побег со стручками, измененными по длине и форме, с небольшим количеством семян (рис. 1б). Полноценные побеги с развитыми стручками развились только через 50–55 дней.

На ДД как минимум два фактора могут играть ключевую роль при переходе растения от вегетативной стадии развития к генеративной: фотопериодизм и гиббереллины [4]. При этом фотопериодический путь играет основную роль в индукции цветения, а ГК выполняют вспомогательную функцию [4].

Наши результаты демонстрируют, что позднее зацветание *grusp-115*, вероятно, связано со сниженным содержанием биологически активных ГК1 и ГК3 (рис. 2) и может быть устранено обработкой растений экзогенными ГК (рис. 3). Важным параметром роста и развития *A. thaliana* является количество розеточных листьев [2, 14]. В условиях ДД Col-0 формирует 10–14 розеточных листьев, после чего апикальная меристема побега перестраивается в меристему соцветия [14]. В нашем исследовании растения Col-0 сформировали в среднем по 11 розеточных листьев за период вегетативного роста, в то время как *grusp-115* переходили к цветению только при наличии 14 ли-

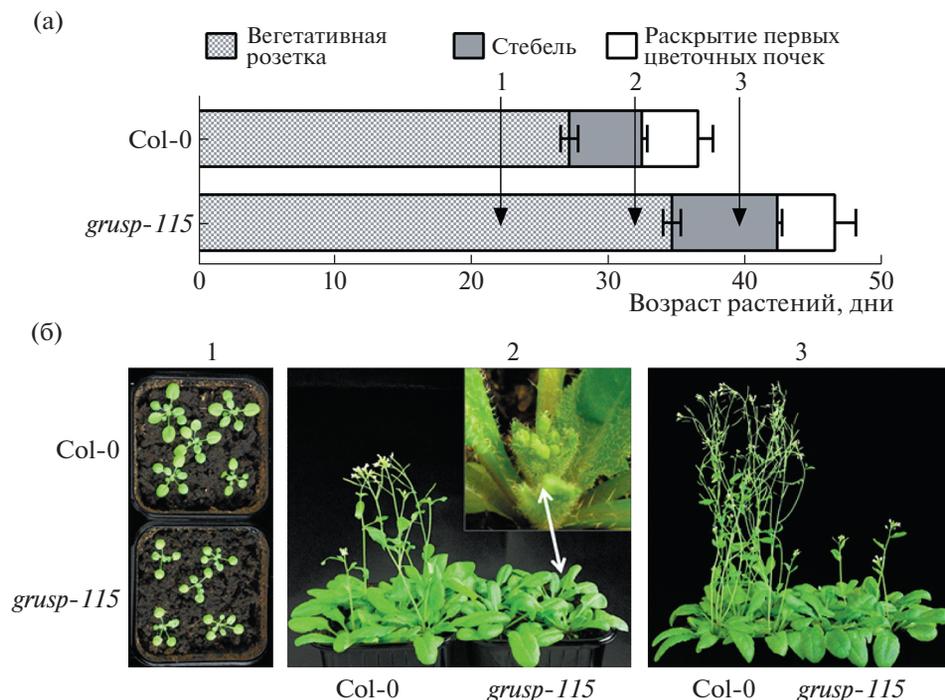


Рис. 1. Характеристика растений Col-0 и *grusp-115* в условиях роста на длинном дне: а – диаграмма развития растений согласно Бойес (Boyes) [14]. Цифрами обозначена группа растений, чей возраст соответствует (1) – 23, (2) – 34 и (3) – 42 дням роста после стратификации, и у которых были собраны образцы розеточных листьев для анализа содержания транскриптов генов *FT* и *FLC* методом qRT-PCR; б – внешний вид (1) – 23, (2) – 34 и (3) – 42- дневных растений.

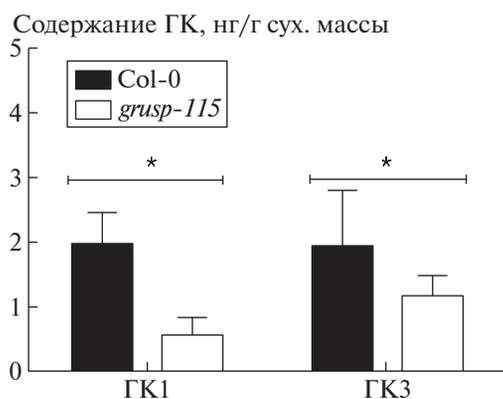


Рис. 2. Содержание биоактивных гиббереллинов ГК1 и ГК3 в тканях 4-недельных вегетативных розеток растений Col-0 и *grusp-115*. Звездочкой обозначены статистически достоверные различия между Col-0 и *grusp-115* согласно критерию Стьюдента (* – $p < 0.1$).

ствев (рис. 3а). Обработка растений экзогенными ГК ускоряла переход к репродуктивной стадии Col-0, который наблюдался при наличии у растений не 11, а лишь 9 листьев. Растения *grusp-115* реагировали на обработку ГК сходным образом (рис. 3б). Они зацветали так же, как Col-0, после формирования 9 розеточных листьев (рис. 3а). Таким образом, отставание в переходе к цветению,

выраженное в количестве розеточных листьев, полностью устранялось у *grusp-115* при обработке экзогенными гиббереллинами. ГК-зависимое восстановление позднецветущего фенотипа *grusp-115* до фенотипа Col-0 подтверждает идею о том, что трансгенная линия испытывает дефицит эндогенных ГК (рис. 2). В то же время обработка ГК *grusp-115* не устраняла более поздний (на 10 дней)

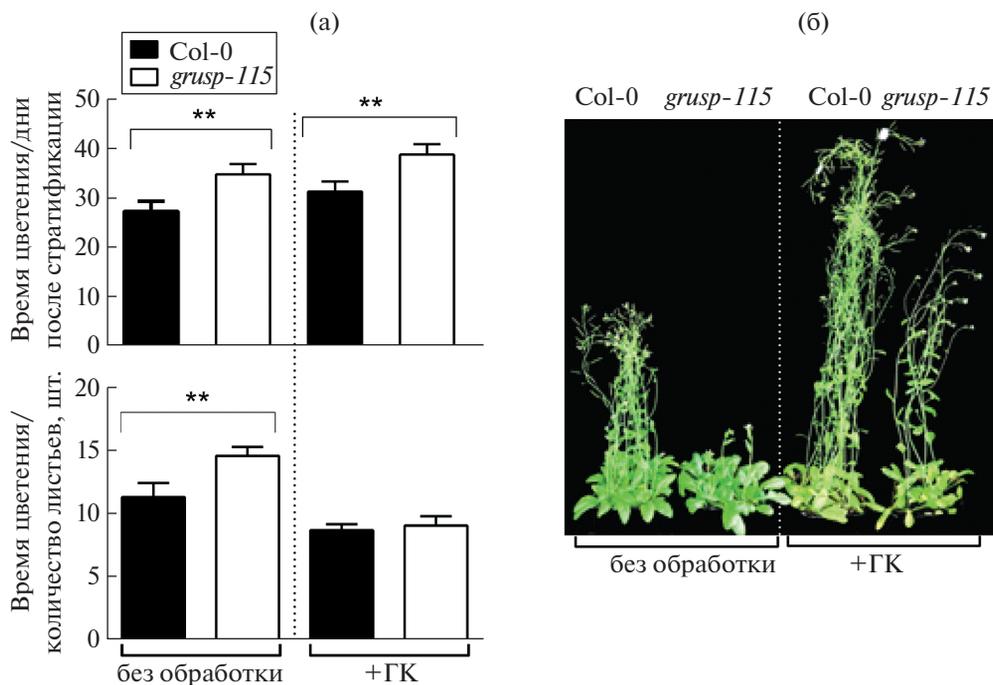


Рис. 3. Реакция растений Col-0 и *grusp-115* на обработку 100 мкМ раствором экзогенных гиббереллинов ГК₄₊₇: а – время цветения растений, выраженное в количестве дней после стратификации и количестве розеточных листьев на момент появления цветочной почки в розетке; б – фенотип растений до и после обработки ГК через 42 дня роста. Звездочками обозначены статистически достоверные различия между Col-0 и *grusp-115* согласно критерию Стьюдента (** – $p < 0.05$).

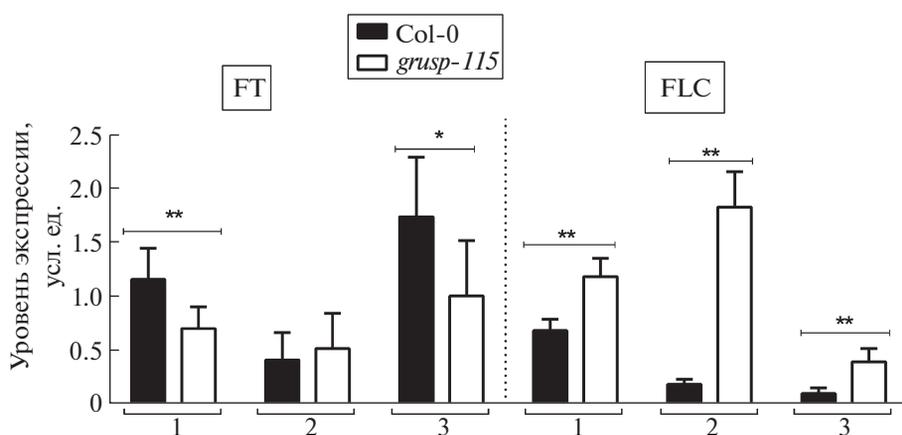


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов *FT* и *FLC* в розеточных листьях растений Col-0 и *grusp-115*. Образцы отбирали на разных стадиях роста растений, соответствующих их возрасту в 23 (1), 34 (2) и 42 (3) дня после стратификации. Звездочками обозначены статистически достоверные различия между Col-0 и *grusp-115* согласно критерию Стьюдента (* – $p < 0.1$, ** – $p < 0.05$).

переход к цветению трансгенной линии по сравнению с Col-0 (рис. 3а).

Для поиска других возможных причин временного отставания перехода к цветению линии *grusp-115* от Col-0 был проанализирован уровень

экспрессии ключевых флоральных генов *FT* и *FLC* в розетках двух сравниваемых линий на разных стадиях развития растений (рис. 4). Для этого использовали розеточные листья растений 23-, 34- и 42-дневного возраста, обозначенные под

номера 1, 2, и 3 соответственно. Ген *FT* экспрессировался на низком уровне в листьях любого возраста (рис. 4), но с максимальной интенсивностью в возрасте 42 дней (3), что соответствует цветущему растению со сформированными соцветиями (рис. 1б). Растения *grusp-115* демонстрировали сниженный уровень экспрессии гена *FT* как на стадии вегетативного роста в возрасте 23 дней (1), так и на стадии перехода к цветению в возрасте 42 дней (рис. 4; (3)).

Репрессор цветения *FLC*, подавляющий экспрессию ряда флоральных генов, в том числе и *FT*, тормозит переход к генеративной стадии развития [6]. На рис. 4 видно, что уровень экспрессии гена *FLC* выше у *grusp-115* на всех изученных стадиях роста (1–3; рис. 1а), чем у Col-0. Эта разница максимальна в возрасте 34 дней (2), когда растения Col-0 уже находятся на стадии формирования побегов соцветия, а *grusp-115* все еще находятся в вегетативном состоянии. Более того, уровень транскриптов *FLC* повышен у *grusp-115* даже после появления бутонов (3), что объясняет у него пониженную экспрессию гена *FT*.

Таким образом, мы впервые показали, что в основе более позднего перехода к цветению Т-ДНК инсерционной трансгенной линии *grusp-115 A. thaliana* по сравнению с диким типом является низкое содержание биологически активных эндогенных ГК1 и ГК3, а также слабая экспрессия гена *FT* из-за повышенного накопления флорального репрессора *FLC*. Мы предполагаем, что белок GRUSP является новым регуляторным компонентом в сигнальных путях, обеспечивающих переход к цветению.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, проект № 18-04-00043. Часть исследования проведена при финансовой поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 0087-2021-0003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kinoshita A., Richter R. Genetic and molecular basis of floral induction in *Arabidopsis thaliana* // Journal of Experimental Botany. 2020. V. 71. № 9. P. 2490–2504.
2. Wilson R.N., Heckman J.W., Somerville C.R. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days // Plant Physiology. 1992. V. 100. P. 403–408.
3. Galvão V.C., Horrer D., Küttner F., et al. Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana* // Development. 2012. V. 139. P. 4072–4082.
4. Porri A., Torti S., Romera-Branchat M., et al. Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods // Development. 2012. V. 139. P. 2198–2209.
5. Wang H., Pan J., Li Y., et al. The DELLA-CONSTANS transcription factor cascade integrates gibberellic acid and photoperiod signaling to regulate flowering // Plant Physiology. 2016. V. 172. P. 479–488.
6. Moon J., Lee H., Kim M., et al. Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiology. 2005. V. 46. № 2. P. 292–299.
7. Shu K., Luo X., Meng Y., et al. Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition // Plant Cell Physiology. 2018. V. 59. № 2. P. 215–221.
8. Wang Y., Li L., Ye T., et al. The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis* // Journal of Experimental Botany. 2013. V. 64. № 2. P. 675–684.
9. Shu K., Chen Q., Wu Y., et al. ABI4 mediates antagonistic effects of abscisic acid and gibberellins at transcript and protein levels // The Plant Journal. 2016. V. 85. P. 348–361.
10. Shu K., Chen Q., Wu Y., et al. ABCISIC ACID-INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS C transcription // Journal of Experimental Botany. 2016. V. 67. № 1. P. 195–205.
11. Li M., An F., Li W., et al. DELLA proteins interact with FLC to repress flowering transition // Journal of Integrative Plant Biology. 2016. V. 58. P. 642–655.
12. Горшкова Д.С., Гетман И.А., Воронков А.С., и др. Ген универсального стрессового белка *AtUSP* регулируется фитогормонами и вовлекается в прорастание семян *Arabidopsis thaliana* // Доклады Академии Наук. 2018. Т. 479. № 5. С. 578–581.
13. Gorshkova D.S., Pojidaeva E.S. Members of the Universal Stress Protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germinated growth // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. V. 68. № 3. P. 451–462.
14. Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., et al. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants // Plant Cell. 2001. Vol. 13. № 7. P. 1499–1510.
15. Kolachevskaya O.O., Sergeeva L.I., Floková K. et al. Auxin synthesis gene *tms1* driven by tuber-specific promoter alters hormonal status of transgenic potato plants and their responses to exogenous phytohormones // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. P. 419–435.
16. Eriksson S., Böhlenius H., Moritz T., et al. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation // The Plant Cell. 2006. V. 18. P. 2172–2181.

**GRUSP, AN UNIVERSAL STRESS PROTEIN, IS INVOLVED
IN GIBBERELLIN-DEPENDENT INDUCTION OF FLOWERING
IN *Arabidopsis thaliana***

**D. S. Gorshkova^{a,b}, I. A. Getman^a, L. I. Sergeeva^{a,c},
Corresponding Member of RAS V. V. Kuznetsov^{a,b}, and E. S. Pojidaeva^{a,#}**

^a *K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russian Federation*

^b *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation*

^c *Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands*

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

The effect of T-DNA insertion in the 3'-UTR region of *Arabidopsis thaliana* *At3g58450* gene encoding the Germination-Related Universal Stress Protein (GRUSP) was studied. It was found that under a long-day condition this mutation delays transition to flowering of *grusp-115* transgenic line that due to a reduced content of endogenous bioactive gibberellins GA1 and GA3 in comparison to the wild-type plants (Col-0). Exogenous GA accelerated flowering of both lines but did not change the time of difference in the onset of flowering between Col-0 and *grusp-115*. In addition to changes in GA metabolism, *grusp-115* evidently has disturbances in realization of the signal that induces flowering. This is confirmed by the results of gene expression of the floral integrator FLOWERING LOCUS T (FT) and the floral repressor FLOWERING LOCUS C (FLC), which are key flowering regulators and acting opposite. We hypothesize that the formation of *grusp-115* phenotype can also be affected by a low expression level of *FT* due to up-regulated *FLC* expression.

Keywords: flowering, phytohormones, universal stress protein, *At3g58450*, GRUSP

УДК 631.8; 631.4

О ДЕЙСТВИИ СОРБЦИОННО-СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН

© 2021 г. Член-корреспондент РАН С. А. Шоба¹, Г. Н. Федотов¹,
И. В. Горепекин¹, Д. И. Потапов¹, Т. А. Грачева^{1,*}

Поступило 26.03.2021 г.

После доработки 07.04.2021 г.

Принято к публикации 08.04.2021 г.

Изучено влияние различных видов воздействий на почвенные образцы на прорастание в них семян и развитие проростков в сравнении с песком (аллелотоксичности). Установлено, что различные виды пробоподготовки могут заметно изменять аллелотоксичность почв. Показано, что исходная почва оказывала на развитие проростков стимулирующее воздействие (+23%). Всушивание до воздушно-сухого состояния с последующим увлажнением увеличивало аллелотоксичность почвенных образцов до –27%. Автоклавирование образцов при 148°C (4.5 атм) увеличивало их аллелотоксичность до –77%. Полученные данные позволяют предположить, что аллелотоксины могут находиться в почвах в активном и закрепленном состояниях и переходить из закрепленного состояния в активное при применении различных видов воздействий на почвы. Изучение влияния аллелотоксичности образцов почв на эффективность применения сорбционно-стимулирующего препарата (ССП), используемого для предпосевной обработки семян яровой пшеницы, показало, что при росте аллелотоксичности почв эффект от применения СПП монотонно снижается. Проведенные оценочные расчеты показали, что количество сорбента применяемого для защиты семян от аллелотоксинов на 3–4 порядка меньше того количества, которое способно закрепить аллелотоксины, содержащиеся в почвах. Из этого следует, что на развитие проростков семян оказывают влияние только небольшая часть аллелотоксинов, находящихся в почвах в активном состоянии.

Ключевые слова: аллелотоксичность почв, стимуляция семян, предпосевная обработка семян, поглощение растениями аллелотоксинов из почв, обменная сорбция

DOI: 10.31857/S2686738921040235

Для стимулирующей предпосевной обработки семян используют различные химические вещества, физические воздействия, а также биологические препараты [1–4].

Было выдвинуто предположение [5], что недостаточная эффективность подобных обработок связана с наличием в почвах аллелотоксинов [6–9], которые угнетающе действуют на растения и снижают эффект от применения стимуляторов.

В работе [5] было предложено обрабатывать семена составами, которые кроме стимуляторов содержат сорбенты, поглощающие и закрепляющие аллелотоксины, что позволило повысить эффективность применения препаратов за счет снижения негативного воздействия аллелотоксинов на прорастание семян зерновых культур и развитие из них растений. При этом природа действия

сорбционных препаратов была не совсем понятна.

Целью работы являлось выяснение причины эффективности применения для обработки семян сорбционных препаратов.

В экспериментах использовали семена яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов “Лиза” и “Любава”, предоставленные “ФИЦ “Немчиновка”, с лабораторной всхожестью не менее 95%.

Проращивали семена в образцах агродерново-глубокоподзолистой легкосуглинистой почвы из окрестностей поймы р. Яхрома, которую готовили различными способами. В работе использовали образцы исходной почвы (И), которые хранили, поддерживая их влажное состояние. Другие образцы готовили общепринятым в почвоведении способом – после отбора образца его доводили до воздушно-сухого состояния. Для получения из него увлажненного образца добавляли воду при тщательном перемешивании и выдерживали в таком состоянии не менее 2 нед. Такие образцы имели индекс ВУ. Третью группу образцов готовили, проводя автоклавирование исходных поч-

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

*e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru

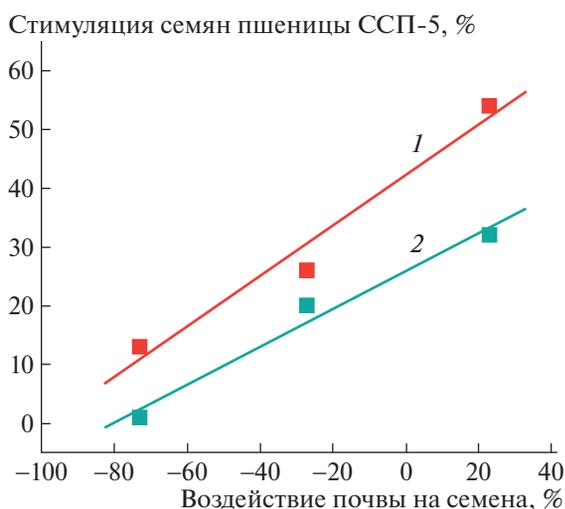


Рис. 1. Влияние аллелотоксичности образцов дерново-подзолистой почвы на действие стимулятора ССП-5 при обработке им семян яровой пшеницы сортов "Лиза" (1) и "Любава" (2) при расходе препарата 40 л/т семян.

венных образцов при 148°C (4.5 атм) в течение 2 ч (индекс Авт).

Для защитного действия семян от почвенных аллелотоксинов использовали гумат калия (Г), произведенный из бурого угля, и бентонит кальция (БК), к которым добавляли автолизат пивных дрожжей (АПД). Применяли суспензии сорбционного препарата, содержащие БК — 40 г/л, Г — 10 г/л, АПД — 12 г/л. К компонентам сорбционного препарата добавляли гиббереллин 90%-ный (Китай) в концентрации 300 мг/л и полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 400 у.е. в концентрации 300 мг/л. Данный 5-компонентный препарат назвали ССП-5 (сорбционно-стимулирующий препарат пятикомпонентный). Подбор состава препарата был проведен в работах [5, 11].

Обработку семян проводили полусухим способом при расходе 40 и 60 л раствора (суспензии) препарата на тонну семян.

Изучали изменение интегральной длины проростков 7.5 г семян (~200 шт.), которую определяли, используя экспресс-метод биотестирования¹, основанный на существовании линейной зависимости между насыпным объемом семян с проростками в воде и длиной их проростков [10].

¹ Биотестирование на данный момент считается единственным методом, пригодным для изучения аллелотоксичности почв [6]. Связано это с тем, что даже зная концентрации сотен аллелотоксинов, которые могут содержаться в почвах, невозможно предсказать эффект от их совместного действия из-за взаимного влияния аллелотоксинов друг на друга и разной степени их закрепления в почвах.

Для определения воздействия почв на развитие семян (аллелотоксичности почв) проводили сравнительные испытания по развитию проростков семян в песке и почвах [6]. При проведении этих экспериментов принимали за 100% развитие семян в песке и рассчитывали относительно полученного значения замедление или ускорение развития проростков семян почвой.

Для определения эффективности действия стимулирующих препаратов проводили сравнительное изучение развития в образцах почв необработанных семян (контроль) и обработанных ССП-5 семян.

Применяли шестикратную повторность с последующей статистической обработкой результатов. Использование в одном опыте 1000–1200 семян позволяло снизить ошибку, связанную с разноточностью [3] семян до 7%.

Вегетационные опыты проводили в прямоугольном вегетационном сосуде (40 × 18 × 15 см). Вегетационный сосуд заполняли исходной дерново-подзолистой почвой. Семена по 20 штук (обработанные и необработанные) высевали на глубину 5 см. При помощи фитоламп создавали длину дня 18 ч. Через 7 дней после посева проводили взвешивание зеленой массы растений. В связи с небольшим числом используемых в вегетационном эксперименте семян результаты имели полуколичественный характер.

Проведенные эксперименты показали, что образцы одной и той же почвы, которые готовили разными способами, заметно отличались по аллелотоксичности — скорости развития проростков семян в сравнении с их развитием на лишенном аллелотоксинов песке. Образец исходной почвы (И) стимулировал развитие проростков семян на +23%, ВУ образцы угнетали развитие семян на 27%, автоклавированные образцы угнетали развитие семян на 77%². Это свидетельствовало о том, что аллелотоксины в почвах находятся в доступной и недоступной для растений формах, а различные обработки образцов (высушивание или автоклавирование) переводят большее количество аллелотоксинов в доступное для растений состояние.

Можно было ожидать, что разная аллелотоксичность почвенных образцов будет оказывать отличающееся влияние на действие сорбционно-стимулирующих препаратов.

Для установления механизма перехода аллелотоксинов из почв в семена (растения) изучили влияние аллелотоксичности почв на действие

² Следует отметить, что автоклавирование образцов при 125°C, а также прогрев влажных образцов при температуре 80–100°C в замкнутых сосудах не приводят к значимому увеличению аллелотоксичности. Она близка к нулю.

ССП-5 при обработке им семян пшеницы сортов “Лиза” и “Любава” (рис. 1).

Из полученных данных (рис. 1) хорошо видно, что эффективность действия ССП-5 с ростом аллелотоксичности почвенных образцов снижается достаточно монотонно. Подобное не должно было бы наблюдаться, если бы процесс лимитировался только предотвращением сорбентом попадания аллелотоксинов в семена. В этом случае после достижения концентрации аллелотоксинов величины сорбционной емкости сорбента (по аллелотоксинам) эффективность применения препарата должна была бы снижаться скачкообразно. Однако этого не происходит, что позволяет предполагать наличие сопоставимости величины сорбционной емкости ССП-5 с содержанием доступных растениям аллелотоксинов в навесках почвы, в которые их высевают.

Проведем небольшой расчет. На обработку 7.5 г (~ 200 шт.) семян мы расходует в виде суспензии 18 мг сухого препарата, которые при проведении вегетационных опытов высеваем в 20 кг почвы. Почвенные растворы, вызывающие угнетение растений, содержат 500–1000 мг/л аллелотоксинов (в пересчете на кумарин) [6]. Учитывая, что влажность почв, с которыми мы работаем, около 20%, в 20 кг почвы только в почвенном растворе должно содержаться ориентировочно 1500–4000 мг аллелотоксинов. Вполне очевидно, что 18 мг сорбционного препарата не могут закрепить такое количество аллелотоксинов.

Однако литературные данные [11] и результаты вегетационных опытов (рис. 2) свидетельствуют об эффективности применения сорбционно-стимулирующих препаратов для предпосевной обработки семян. Из полученных данных следует, что в контроле из 20 семян яровой пшеницы сорт “Лиза” проросло только 17 (обработанные семена проросли все), а наземная вегетативная масса проростков, выросших из обработанных семян, была почти на 40% больше массы проростков, выросших в контроле (1.65 и 1.19 г), что хорошо видно на фотографии (рис. 2).

Таким образом, возникает противоречие: “сорбент не может стимулировать развитие проростков семян за счет поглощения всех почвенных аллелотоксинов из-за их большого количества, но он стимулирует”.

Для объяснения наличия стимулирующего эффекта при применении сорбционных препаратов необходимо предположить, что на растения действует очень небольшая часть всех почвенных аллелотоксинов, и их количество сравнимо с сорбционной емкостью ССП-5, используемого для обработки семян. Из этого следует, что лимитирует ингибирование растений, в первую очередь, не количество аллелотоксинов в почвах, а процесс поступления аллелотоксинов из почв в семена.



Рис. 2. Яровая пшеница сорт “Лиза”, выросшая в дерново-подзолистой почве за 6 сут из необработанных семян (1) и семян обработанных сорбционно-стимулирующим препаратом (кальциевый бентонит – 40 г/л, гумат – 10 г/л, автолизат пивных дрожжей – 12 г/л, гиббереллин – 300 мг/л и полиэтиленгликоль с молекулярной массой 400–300 мг/л) с расходом 60 л суспензии препарата на тонну семян (2).

Следовательно, процесс поступления аллелотоксинов из почв в семена не является свободным, а обусловлен определенными ограничениями. Наиболее вероятным ограничением является освобождение аллелотоксинов из почв за счет обменных реакций с веществами, выделяемыми растениями (семенами). Если принять, что процессы обменной сорбции с поступлением аллелотоксинов в семена происходят лишь на почвенных частицах примыкающих к зерновкам, то наблюдаемые результаты получают логичное объяснение.

На основе предложенного механизма поступления аллелотоксинов из почв в семена и развивающиеся растения следует, что для стимуляции растений необходимо, чтобы сорбционные препараты могли “перехватывать” аллелотоксины, находящиеся в почве в непосредственной близости от растительных объектов. Причем, если эффект при использовании сорбционного препарата для обработки семян на почвах с более высокой аллелотоксичностью снижается, то должно быть достаточно несколько поднять дозу препарата, чтобы обеспечить поглощение ингибирующих зерновки аллелотоксинов.

Последний вывод был проверен экспериментально. Увеличение расхода ССП-5 при обработке им семян яровой пшеницы сорт “Лиза” с 40 до 60 л на тонну семян привело на ВУ почве к значительному повышению эффективности его приме-

нения с 25 до 50%, т.е. эффект вырос до величины, наблюдаемой на образцах исходной почвы.

Таким образом, в ходе проведенных опытов было установлено, что аллелотоксины в почвах могут присутствовать как в активном, так и в недоступном для растений состояниях. Аллелотоксины в активном состоянии за счет обменных реакций поступают в растения из прилегающих к ним областей почв. Необходимость сорбировать аллелотоксины только из почвенных частиц, примыкающих к зерновкам и освобождаемых из почв за счет обменных реакций, обеспечивает эффективность применения сорбционно-стимулирующих препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимов И.В., Абыльгильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 373–385.
2. Назарова А.А., Полищук С.Д. Особенности роста и развития кукурузы гибрида “Обский 140” при обработке семян препаратами на основе наночастиц железа, кобальта и их сочетания // Плодоводство и ягодоводство России. 2017. Т. 48. № 1. С. 174–177.
3. Сечняк Л.К., Киндрок Н.А., Слюсаренко О.К., Иващенко В.Г., Кузнецов Е.Д. Экология семян пшеницы. – М.: Изд. Колос, 1983. 349 с.
4. Araújo S.D.S., Paparella S., Dondi D., Bentivoglio A., Carbonera D., Balestrazzi A., Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology // *Frontiers in plant science*. 2016. V. 7. P. 1–12.
5. Федотов Г.Н., Шоба С.А., Горепекин И.В. Аллелотоксичность почв и способ уменьшения ее негативного влияния на начальную стадию развития растений // Почвоведение. 2020. № 8. С. 1007–1015.
6. Гродзинский А.М., Богдан Г.П., Головкин Э.А., Дзюбенко Н.Н., Мороз П.А., Прутенская Н.И. Аллелопатическое почвоутомление. Киев: Наук. думка, 1979. 248 с.
7. Allelopathy. A Physiological Process with Ecological Implications. Edited by M.J. Reigosa, N. Pedrol and L. Gonzalez. Published by Springer. Printed in the Netherlands. 2006. 637 p.
8. Cheng F., Cheng Z. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy // *Frontiers in Plant Science*. 2015. V. 6. Article 1020.
9. Jilani G., Mahmood S., Chaudhry A.N., Hassan I., Akram M. Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil – a review // *Annals of Microbiology*. 2008. 58. № 3. P. 351–357.
10. Федотов Г.Н., Шоба С.А., Федотова М.Ф., Горепекин И.В. Влияние аллелотоксичности почв на прорастание семян зерновых культур // Почвоведение. 2019. № 4. С. 489–496.
11. Шоба С.А., Горепекин И.В., Федотов Г.Н., Грачева Т.А., Салимгареева О.А. Природа повышения эффективности применения сорбционно-стимулирующих препаратов для предпосевной обработки семян при введении в их состав неионогенных ПАВ // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 494. С. 513–516.

ON THE SORPTION-STIMULATING PREPARATIONS INFLUENCE ON SEED GERMINATION

Corresponding Member of the RAS S. A. Shoba^a, G. N. Fedotov^a, I. V. Gorepekin^a,
D. I. Potapov^a, and T. A. Gracheva^{a,#}

^a Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru

The influence of various types of impacts on soil samples on the germination of seeds and the development of seedlings in comparison with sand (allelotoxicity) was studied. It is established that various preparing of soil samples can significantly affect their allelotoxicity. It is shown that initial soil stimulated seedlings development (+23%). Drying to air-dry condition with further wetting increased the allelotoxicity to – 27%. Autoclaving of samples (148°C, 4.5 atm) increased their allelotoxicity to – 77%. Received data allow suggesting that allelotoxins can exist in the soil in active and fixed forms and move from the fixed form to the active form when applying various types of impacts on the soil. The study of the influence of soil samples allelotoxicity on the application efficiency of sorption-stimulating preparation (SSP), used for the pre-sowing treatment of spring wheat seeds, shows that the application effect of SSP monotonously decreases when allelotoxicity increases. The conducted calculations show that the amount of sorbent used to protect seeds from allelotoxins is 3–4 orders of magnitude less than the amount that can fix allelotoxins contained in soils. It follows that the development of seed seedlings is influenced only by a small part of allelotoxins, existing in soils in the active state.

Keywords: allelotoxicity of soils, seed stimulation, pre-sowing seed treatment, sorption-stimulating preparation, the effect of soil allelotoxicity on the effectiveness of the stimulants use, the uptake of allelotoxins from the soils by plants

УДК 577.322.75

ВЛИЯНИЕ ГИПОХЛОРИТ- И ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ ФИБРИНОГЕНА НА СТРУКТУРУ ФИБРИНА

© 2021 г. Л. В. Юрина^{1,*}, А. Д. Васильева¹, Л. А. Вассерман¹, Н. А. Подоппелова^{2,3}, член-корреспондент РАН М. А. Пантелеев^{2,3}, М. А. Розенфельд¹

Поступило 29.12.2020 г.

После доработки 11.04.2021 г.

Принято к публикации 12.04.2021 г.

Впервые методами динамического и упругого светорассеяния, а также конфокальной лазерной сканирующей микроскопии исследовались нарушения пространственной структуры фибрина при пероксид- и гипохлорит индуцированном окислении фибриногена. В то время как перекись водорода оказывала слабый эффект на структурную организацию фибрина, действие гипохлорита вызывало образование аномального фибрина с тонкими волокнами и мелкопористой структурой. Измерения распределения по размерам нативного и окисленного ФГ обнаружили уменьшение гидродинамического размера молекулы ФГ при увеличении концентрации окислителей. Это свидетельствовало о росте гидрофобности поверхности белка и снижении его коллоидной устойчивости. В работе анализируется возможная роль окислительных сайтов в сборке аномального по структуре фибрина.

Ключевые слова: фибриноген, фибриновый гель, окисление, упругое и динамическое светорассеяние, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

DOI: 10.31857/S2686738921040260

Образование фибринового сгустка, являющееся одним из важнейших процессов свертывания крови, включает катализируемую тромбином генерацию молекул мономерного фибрина из фибриногена и последующую их спонтанную полимеризацию, в результате которой формируется сеть произвольно ориентированных стержнеподобных волокон фибрина.

Фибриноген (ФГ) представляет собой высоко уязвимую потенциальную мишень для окислителей [1], вследствие чего посттрансляционные модификации ФГ, возникающие как *in vitro* при индуцированном окислении, так и *in vivo* при развитии окислительного стресса, способны вызывать нарушение пространственной организации фибрина, его вязко-эластических и биохимических свойств. Морфология такого фибрина характеризуется преимущественно тонкими волокнами, обладающими уменьшенной механической проч-

ностью, мелкопористой структурой, что, в конечном итоге, обуславливает возрастающую резистентность фибриновой сети к фибринолизу [2, 3]. Эти данные легли в основу концепции взаимосвязи между окислительным стрессом, нарушениями структуры фибрина и риском возникновения кардиоваскулярных заболеваний [4, 5].

Полагают, что доминирующий вклад в нарушение пространственной организации окисленного фибрина вносит окислительная модификация метионина $\text{A}\alpha\text{Met}476$, локализованного в αC -доменах ФГ [3]. Окисление этого остатка, как полагают [3], ослабляет взаимодействия между соседними αC -доменами, играющими важную роль в латеральной агрегации фибриновых протофибрилл. Однако образование аномального, “грубого” фибрина, образованного из озонированного ФГ, не подтверждает этот вывод [6, 7].

Ранее методом масс-спектрометрии было показано, что гипохлорит-индуцированное окисление ФГ вызывает в белке множественные модификации, затрагивающие широкий набор аминокислотных остатков [8, 9], в то время как пероксид-индуцированное окисление ФГ ограничивалось лишь модификациями некоторых остатков Met, Trp и His [10].

В настоящей работе совокупностью методов упругого и динамического светорассеяния, а также конфокальной микроскопии исследуется вли-

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

*e-mail: lyu.yurina@gmail.com

ание гипохлорит- и пероксид-индуцированного окисления ФГ на архитектуру образующегося фибрина и анализируется возможная природа такого влияния.

ФГ был выделен из цитратной плазмы крови доноров методом глицинового осаждения. Окисление ФГ индуцировали либо раствором H_2O_2 (Sigma-Aldrich, США), либо гипохлоритом (Sigma-Aldrich, США) в концентрациях 25, 50 и 300 мкМ/2.94 мкМ белка соответственно. Реакции протекали в течение часа при температуре 37°C, после чего останавливались 10-молярным избытком L-метионина [3]. Удаление метионина из раствора проводили центрифугированием с помощью фильтров Amicon Ultra (10 kDa, UFC501096, Merck, Darmstadt, Germany).

Реакция превращения ФГ в фибрин, катализируемая тромбином, проводилась в микропланшетах при 37°C в течение 60 мин [10]. Кинетику реакции регистрировали на xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (США) при длине волны 350 нм.

Метод динамического светорассеяния был использован для получения распределения молекул ФГ по размерам. Измерения проводили на приборе Zetasizer-Nano S (Malvern, Англия). Для каждого образца были выполнены три независимых измерения, каждое из которых включало три технические повторности (30 сканов для каждого измерения).

Угловые зависимости упругого светорассеяния образцов фибрина были получены на спектрометре Malvern (Англия) с гелий-неоновым лазером (длина волны лазера $\lambda_0 = 632.8$), как описано ранее [11]. Анализ экспериментальных данных осуществлялся в рамках приближения Carг и Negтans [12] для ансамблей длинных, произвольно ориентированных стержневидных макромолекул. Данные были получены на основании трех независимых экспериментов, каждый из которых имел три технические повторности.

Для ковалентного мечения молекул белка в качестве флуоресцентной метки использовали флуоресцеин изотиоционат (ФИТЦ). Молярное отношение краски к белку в реакционной смеси $MR = 5$. Реакцию проводили в 0.1 М бикарбонатным буфером (pH 9.0) в течение 2 ч (+4°C) при постоянном перемешивании. После чего останавливали реакцию получасовой инкубацией с 30 мМ гидроксиламингидрохлоридом (pH 8.5). Для очистки конъюгата от непрореагировавшей флуоресцентной метки реакционную смесь центрифугировали в течение 1 мин при 16000 g на микроцентрифужных колонках с Sephadex G-25. Степень мечения и концентрацию белка контролировали спектрофотометрически. Для образования фибринового геля смесь (9:1) немеченого и меченого фибриногена (конечная концентрация

белка 3 мкМ), хлорид кальция (конечная концентрация 5 мМ) и тромбин (конечная концентрация 5 нМ) поочередно вносили в реакционную лунку на предметном стекле. Общий объем раствора составлял 30 мкл. После внесения реагентов лунку накрывали покровным стеклом и инкубировали в течение часа при +37°C во влажной камере и исследовали сразу после окончания инкубации. Для получения микрофотографий использовали микроскоп Zeiss Axio Observer Z1 с конфокальным модулем CSU-X1M 5000 (Carl Zeiss, Jena, Germany), снабженный объективом со 100-кратным увеличением.

Исследование кинетики реакции превращения ФГ в фибрин под действием тромбина показало, что окисление ФГ гипохлоритом вызывает существенное ингибирование реакции и снижение мутности геля, но имеет относительно слабый эффект на сборку фибрина при использовании перекиси водорода (рис. 1).

Данные динамического светорассеяния (рис. 2) выявили интересную особенность действия окислителей на молекулы фибриногена. Как видно из рис. 2, при концентрациях $HOCl/OCl^-$, 25 и 50 мкМ распределение молекул по размерам оставалось унимодальным. Однако средний размер молекул фибриногена незначительно уменьшался с 22.92 ± 1.12 нм для нативного фибриногена, до 21.45 ± 1.02 и 20.64 ± 1.02 нм при инкубации белка с 25 и 50 мкМ $HOCl/OCl^-$ соответственно. Для фибриногена, обработанного 300 мкМ $HOCl/OCl^-$, средний размер молекул фибриногена составлял 17.97 ± 1.08 нм. Однако при этом можно наблюдать едва визуально различимое появление относительно высокоразмерных кластеров фибриногена со средним размером ~36 нм. При обработке фибриногена 25 и 50 мкМ H_2O_2 распределение молекул по размерам, также как и в случае гипохлорита, было одноимодальным со средними размерами молекул фибриногена, равными 21.5 ± 0.82 и 22.26 ± 0.90 нм соответственно. При окислении фибриногена 300 мкМ H_2O_2 распределение молекул по размерам становилось бимодальным, характеризующееся средними размерами, равными 15.26 ± 1.76 и 28.54 ± 1.60 нм соответственно.

Выраженное бимодальное распределение по размерам фибриногена, обработанного H_2O_2 (рис. 2), можно объяснить следующими причинами. Изменение молекулярного распределения по размерам наблюдается в результате изменения гидратации молекул фибриногена. Подобно другим белкам [13], окисление остатков метионина в фибриногене, вызванное H_2O_2 , вызывает увеличение гидрофобности поверхности белка, которое обуславливает уменьшение степени гидратации молекул. С увеличением концентрации H_2O_2 этот эффект также усиливается. При обработке

фибриногена 300 мкМ низкоразмерные молекулы (т.е. поверхность которых обладает наибольшей гидрофобностью) агрегируют с образованием кластеров большей размерности.

Как было показано ранее методом масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС) [10], окисление фибриногена, вызванное 300 мкМ H_2O_2 , происходит в основном за счет модификации остатков метионина (18 остатков), наряду с четырьмя остатками Trp и двумя остатками His. Окисление только этих остатков, как мы полагаем, обеспечивает описанный выше механизм снижения коллоидной стабильности молекул фибриногена, обработанных H_2O_2 . В отличие от H_2O_2 , $HOCl/OCl^-$ является мощным окислителем. При обработке фибриногена $HOCl/OCl^-$ наряду с вышеупомянутыми остатками многие другие аминокислотные остатки, такие как Tyr, His, Ser, Asp, Asn, Lys, Pro, Trp, Phe, Arg и Glu были идентифицированы [8, 9]. В этой связи можно предположить, что участие этих остатков в окислительной модификации в той или иной степени нейтрализует влияние окисления метионина на возрастающую гидрофобность поверхности фибриногена. По этой причине, в отличие от пероксида водорода, действие $HOCl/OCl^-$ вызывает незначительный эффект на образование высоко-размерных кластеров.

Угловые зависимости отношения Рэлея, $R(\theta)$ для нормального и окисленного гелей фибрина, как видно из рис. 3, представляют собой прямые линии, проходящие через начало координат. Согласно теории рассеяния света [12], в случае фибринового геля, который можно рассматривать как сеть прямых волокон разной длины, соединенных вместе в некоторых случайно распределенных узловых точках, отношение Рэлея описывается следующим выражением: $R(\theta) = cK\lambda_0\mu/4n_0\sin(\theta/2)$, где c – концентрация белка, $\mu = M/L$ – отношение массы к длине волокна, выраженное в г/(моль см), и n_0 – коэффициент преломления растворителя. K – константа для вертикально поляризованного луча, равная $4\pi^2n_0^2 (dn/dc)^2/(N_A\lambda_0^4)$, где N_A – число Авогадро, n_0 – показатель преломления растворителя, dn/dc – инкремент показателя преломления, равный $0.176 \text{ см}^3/\text{г}$. Вышеприведенная формула позволяет рассчитать значения μ по наклону прямых линий. В случае полимеров фибрина, образованных из нативного фибриногена, это значение составляет $(8.25 \pm 0.47) \times 10^{12} \text{ г}/(\text{моль см})$, (рис. 3, прямая 1). Так как молекула ФГ может быть аппроксимирована палочкой длиной 45 нм при диаметре $\sim 2\text{--}5 \text{ нм}$ [14], величина μ для ФГ составляет $7.55 \times 10^{10} \text{ г}/(\text{моль см})$. Из этого следует, что в условиях модельного эксперимента нативная фибриновая сеть составлена из нитей, толщина которых более чем в сто раз превышает

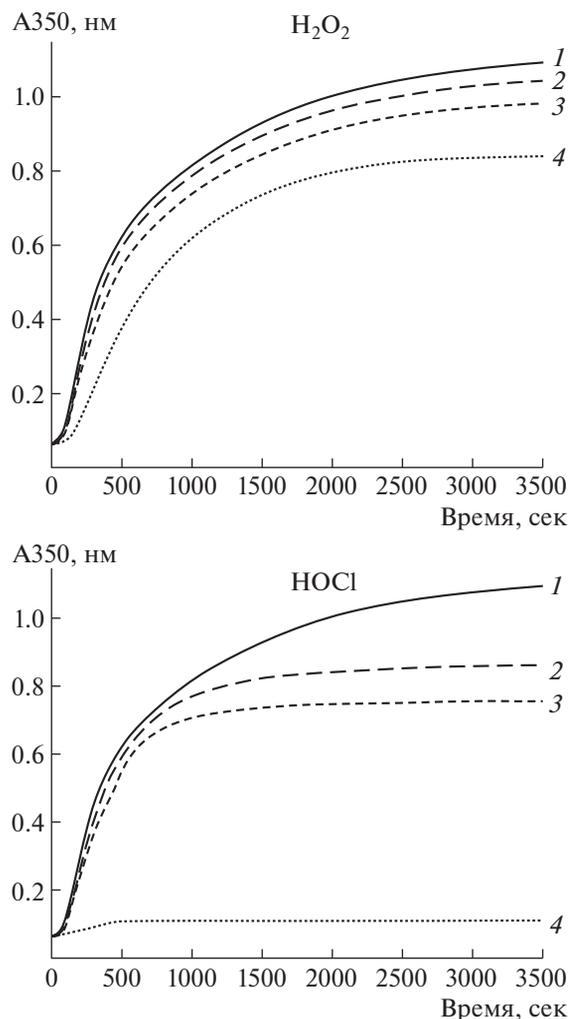


Рис. 1. Кинетика образования фибрина, образованного из окисленного ФГ: 1 – неокисленный ФГ; 2, 3, 4 – ФГ, окисленный 25, 50 и 300 мкМ гипохлорита или такими же количествами перекиси водорода.

таковую, характерную для ФГ. Обработка ФГ гипохлоритом вызывает значительные структурные нарушения в фибрине, проявляющиеся в образовании существенно более тонких фибрилл, по сравнению с контролем (рис. 3, прямые 2 и 3). Величины μ составляли $(6.32 \pm 0.37) \times 10^{12}$ и $(3.09 \pm 0.23) \times 10^{12} \text{ г}/(\text{моль см})$ для фибрина, образованного из ФГ, окисленного 25 и 50 мкМ гипохлорита соответственно. В то же время окисление ФГ перекисью водорода практически не влияло на толщину фибрилл. Как следует из рис. 3, прямые 4, 5 в пределах статистической погрешности отношение массы к длине окисленных фибрилл оказалось равным таковому для неокисленного фибрина. Слабый эффект пероксид-индуцированного окисления ФГ на структуру фибрина был также выявлен методом атомно-силовой микроскопии [15].

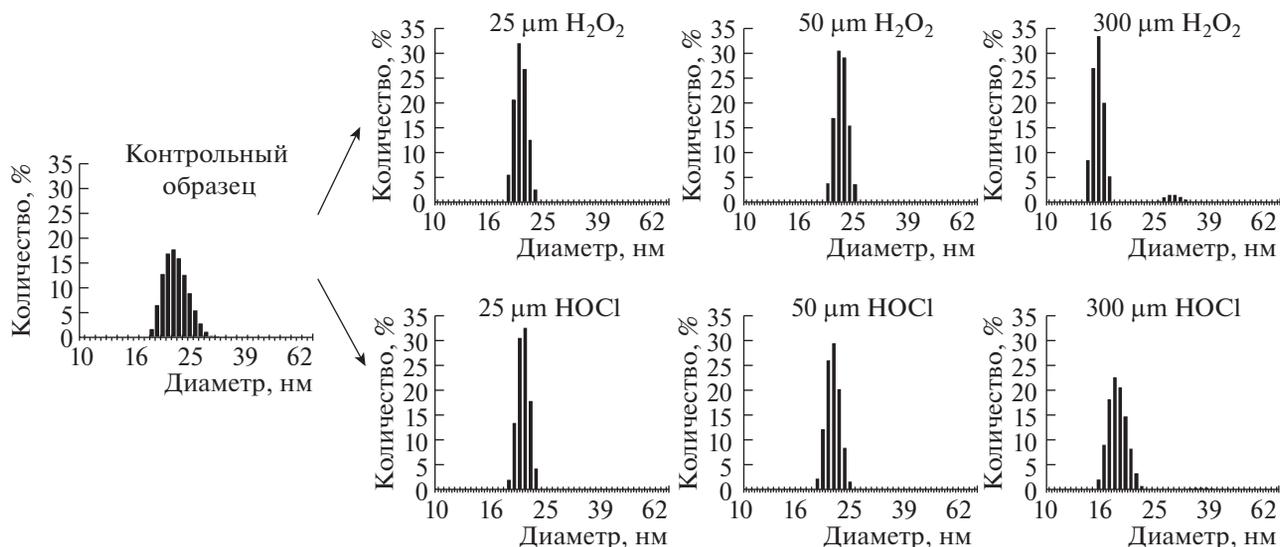


Рис. 2. Распределение по размерам молекул ФГ, окисленных 25, 50 и 300 мкМ гипохлорита или такими же количествами перекиси водорода.

Результаты упругого светорассеяния хорошо согласуются с морфологией фибрина, полученного конфокальной микроскопией (рис. 4). В фибрине, образованном из пероксид-индуцированного ФГ, изменения в структуре незначительны, в то время как в образцах, представленных на рис. 4, отчетливо видно наличие тонких фибрилл и мелкопористой структуры фибрина при обработке ФГ 50 мкМ гипохлорита.

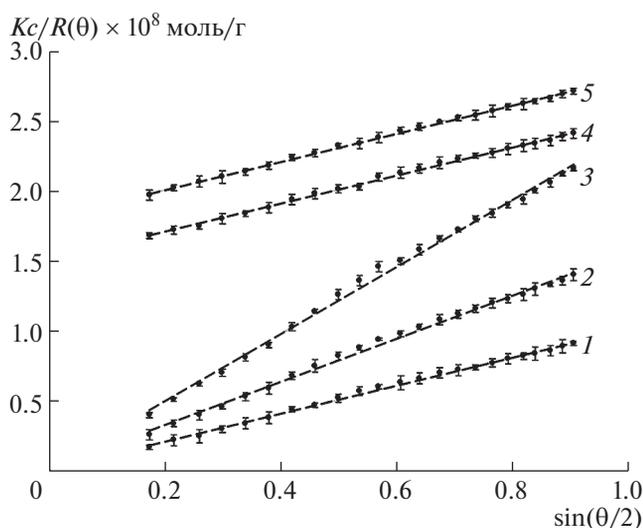


Рис. 3. Угловые зависимости упругого светорассеяния фибрина, образованного из нативного ФГ (1); ФГ, окисленного 25 и 50 мкМ гипохлорита (2, 3 соответственно) и ФГ, окисленного 25 и 50 мкМ перекиси водорода (4, 5 соответственно). Для наглядности прямые 4 и 5 смещены вверх по ординате на 1.5 и 1.8 ед. соответственно.

Посттрансляционные модификации в первичной структуре молекулы ФГ при ее окислении и последствия этих модификаций для вторичной и третичной структуры белка [11], очевидно, проявляются в изменении коагуляционного потенциала ФГ формировать нормальную структуру фибрина. Как полагают [3], модификация остатка $A\alpha$ Met476 в αC -доменах благодаря повреждению структуры N-концевых субдоменов нарушает их способность взаимодействовать друг с другом, обуславливая тем самым ингибирование латеральной агрегации фибриновых протофибрилл. Однако вовлечение в модификацию вышеупомянутого остатка во всех случаях при обработке ФГ озоном, гипохлоритом и перекисью водорода и наблюдаемые различные эффекты на самосборку фибрина являются достаточно веским основанием полагать об ошибочной точке зрения, касающейся функциональной роли метионина $A\alpha$ Met476. Если к этому добавить, что метионин $A\alpha$ Met476 является одним из наиболее уязвимых к окислению остатком по сравнению с другими метионинами в ФГ, можно прийти к выводу, что он выполняет антиоксидантную функцию, как постулировалось ранее [10].

Как свидетельствуют результаты данной работы, воздействие умеренных количеств H_2O_2 на ФГ не сопровождается значимым эффектом на структуру фибрина. В свою очередь, это подразумевает, что обнаруженные модификации в ФГ в результате пероксид-индуцированного окисления [10] не играют особой функциональной роли в образовании фибрина. Функционально важные остатки могли бы располагаться в ряду модифицированных сайтов, идентифицированных в ФГ при его озонировании или обработке гипохлори-

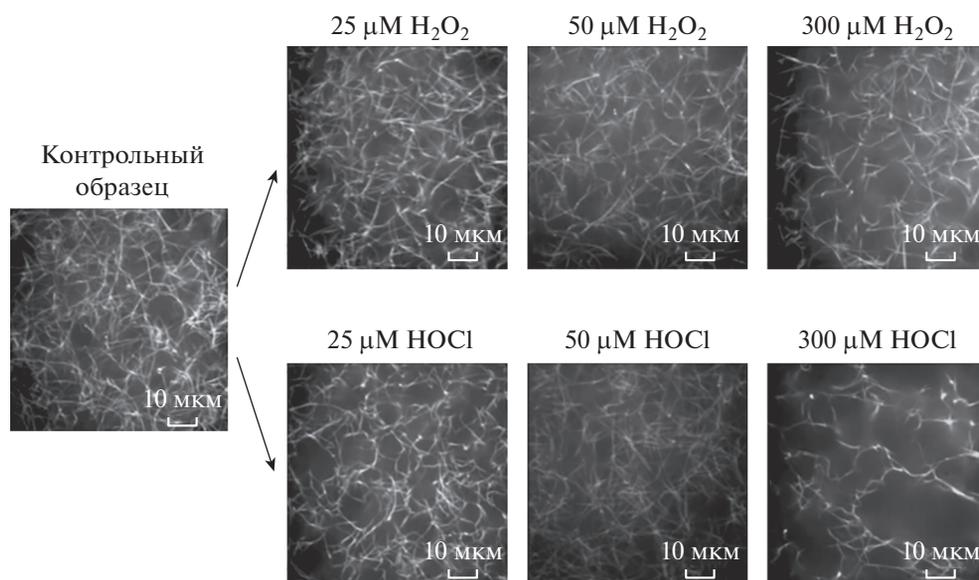


Рис. 4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия различных образцов фибрина. Длина отрезка на фотографиях соответствует 10 мкм.

том за исключением тех модифицированных сайтов, которые были обнаружены в пероксид-индуцированном фибриногене. Кроме того, так как озонирование ФГ или его обработка гипохлоритом вызывала образование грубых [6] или тонких гелей [3], соответственно, необходимо исключить из рассмотрения общие окислительные сайты для обоих окислителей в модифицированном белке. Однако и в этом случае функциональная принадлежность сайтов осложняется главным образом двумя факторами. Во-первых, при использовании метода масс-спектрометрии для картирования первичной структуры окисленного (также как и не окисленного) ФГ отдельные сайты или даже пептидные участки, представляющие мишень для окислителей, могут оказываться не детектированными. Во-вторых, латеральная ассоциация протофибрилл обусловлена участием различных структур ФГ, а не только взаимодействием αC -доменов. В процесс сборки фибрилл вовлекаются также C -концевые субдомены и αC -коннекторы, C -концевые участки γ -цепей, соседние участки β -цепей (β -nodules), суперспиральные структуры (coiled-coils) и некоторые другие [14]. Во всех этих структурах ФГ найдены окислительные сайты, которые могли бы влиять в той или иной степени на латеральную агрегацию [6–10]. Однако какие из этих сайтов могли бы вносить преобладающий вклад в окислительное повреждение структуры фибрина, все еще представляется достаточно неопределенным. В этой связи приписывание отдельным окислительным сайтам конкретных функциональных свойств в образовании аномальной структуры фибрина остается сложной и запутанной проблемой, решение

которой может быть предметом будущих исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования по Государственному заданию (тема 0084-2014-0001) и при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-04-01313.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shacter E., Williams J., Lim M., et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. P. 429–437.
2. Martinez M., Weisel J.W., Ischiropoulos H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots // *Free Radic Biol Med.* 2013. V. 65. P. 411–418.
3. Weigandt K.M., White N., Chung D., et al. Fibrin clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen // *Biophys. J.* 2012. V. 103. № 11. P. 2399–2407.
4. Li W., Sigley J., Pieters M., et al. Fibrin fiber stiffness is strongly affected by fiber diameter, but not by fibrinogen glycation // *Biophys. J.* 2016. V. 110. № 6. P. 1400–1410.
5. Kattula S., Byrnes J.R., Wolberg A.S. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017. V. 37. № 3. P. 13–21.

6. Розенфельд М.А., Леонова В.Б., Константинова М.Л., и др. Самосборка мономерного фибрина и агрегация фибриногена при окислении озоном // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 54–61
7. Yurina L.V., Vasilyeva A.D., Indeykina M.I. et al. Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry // Free Radic. Res. 2019. V. 53. № 4. P. 430–455.
8. Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бугрова А.Е., и др. Индуцированная гипохлоритом окислительная модификация фибриногена // Доклады академии наук. 2019. Т. 484. № 3. С. 367–371.
9. Sovová Ž., Štikarová J., Kaufmanová J., et al. Impact of posttranslational modifications on atomistic structure of fibrinogen // PLoS One 2020. V. 15. № 1. P. 0227543.
10. Юрина Л.В., Васильева А.Д., Кононенко В.Л., и др. Структурно-функциональные повреждения фибриногена в результате пероксид-индуцированного окисления // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2020. Т. 492. № 1. С. 287–292.
11. Rosenfeld M., Shchegolikhin A., Bychkova F., et al. Ozone-induced oxidative modification of fibrinogen: role of the D regions // Free Radic. Biol. Med. 2014. V. 77. P. 106–120.
12. Carr M.E., Jr., Hermans J. Size and density of fibrin fibers from turbidity // Macromolecules 1978. V. 11. № 1. P. 46–50.
13. Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997. V. 9. P. 2969–2974.
14. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties // Subcell Biochem. 2017. V. 82. P. 405–456.
15. Wang L., Li L., Wang H., Liu J. Study on the influence of oxidative stress on the fibrillization of fibrinogen // Biochem J. 2016. V. 473. № 25. P. 4373–4384.

EFFECT OF HYPOCHLORITE- AND PEROXIDE-INDUCED OXIDATION OF FIBRINOGEN ON THE FIBRIN STRUCTURE

**L. V. Yurina^{a,#}, A. D. Vasilyeva^a, L. A. Vasserman^a, N. A. Podoplelova^b,
Corresponded Member of the RAS M. A. Panteleev^{b,c}, and M. A. Rosenfeld^a**

^a N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russian Federation

^c Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: lyu.yurina@gmail.com

By applying the methods of dynamic and elastic light scattering and confocal laser scanning microscopy the damage in the spatial fibrin structure during peroxide- and hypochlorite-induced oxidation of fibrinogen has been explored. While peroxide had weak effect on the structural organization of fibrin, the hypochlorite caused the formation of abnormal fibrin with reduced individual fiber diameter coupled with decreased porosity. Measurements of the size distributions of the different samples of fibrinogen revealed a decrease in the hydrodynamic sizes of the oxidized fibrinogen molecules. These results indicate that the hydrophobicity of fibrinogen surface became increased hereupon the oxidized molecules tended to decrease in its colloidal stability. The possible role of oxidative sites in the assembly of structurally abnormal fibrin is analyzes.

Keywords: fibrinogen, fibrin gel, oxidation, elastic and dynamic light scattering, confocal laser scanning microscopy

УДК 612.811.4, 612.861, 612.313.82, 612.897, 612.899, 57.054

ИЗМЕНЕНИЯ ВРЕМЕННОЙ ОБЛАСТИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА И КОРТИКОСТЕРОНА ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТРАВМАТИЗАЦИИ ПЕРЕГОРОДКИ НОСА У КРЫС

© 2021 г. И. В. Кастыро^{1,*}, В. И. Попадюк¹, академик РАН И. В. Решетов², М. Г. Костяева¹, С. Г. Драгунова¹, Т. Ф. Косырева¹, Г. В. Хамидулин¹, П. Е. Шмаевский¹

Поступило 08.04.2021 г.

После доработки 12.04.2021 г.

Принято к публикации 16.04.2021 г.

Целью настоящей работы было изучить изменения во временном диапазоне variability сердечного ритма (BCP) на фоне изменений концентрации кортикостерона в плазме крови у крыс после хирургической травматизации перегородки носа. Было проведено моделирование септопластики у 30 половозрелых крыс-самцов линии Wistar массой 210–290 г. Проводилась запись ЭКГ с последующим анализом временной области BCP, а также забор крови на изменения концентрации кортикостерона в плазме крови. В результате было установлено, что SDNN достоверно увеличилось, по сравнению с контролем, на 2-е и 3-и сутки ($p < 0.001$), но снизилось на 4–5-й ($p < 0.001$) и 6-й дни ($p < 0.01$). rMSSD изменялся волнообразно с двумя неравномерными пиками на 1-й и 6-й дни. SDNN/rMSSD, по сравнению с 1-м днем послеоперационного периода, на 2-й день увеличилось и продолжило расти ($p < 0.05$), а на 4-й день начало снижаться ($p < 0.01$). Общая мощность BCP была низкой на всем сроке послеоперационного периода ($p < 0.001$), кроме 3-го дня, когда она была равна контрольным данным. Рост показателя общей мощности пришелся на 3-й день после операции ($p < 0.01$), после чего произошел вновь его спад. Концентрация кортикостерона в плазме крови у крыс была достоверно выше, чем до нее ($p < 0.001$). Со 2-го по 4-й послеоперационный день было определено его плато. Моделирование септопластики ведет к изменениям во временном диапазоне BCP, увеличению концентрации кортикостерона в плазме крови у крыс с ее максимумом в момент операции и через 24 ч, образованием “плато” со 2-го по 4-й послеоперационные дни, что совпадает с изменениями BCP.

Ключевые слова: септопластика, variability сердечного ритма, кортикостерон, стресс

DOI: 10.31857/S2686738921040144

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее распространенным хирургическим вмешательством по поводу искривления перегородки носа до сих пор остается септопластика [1, 2], которая может проводиться под местной или общей анестезией [3]. Ранее на биологических моделях нами было показано, что моделирование септопластики приводит к развитию тревожно-подобного состояния вследствие отека слизистой оболочки полости носа, воспалительных явлений [4] и развития дисбаланса со стороны вегетативной нервной системы (ВНС) [5], что проявляется

в изменении поведения крыс в открытом поле. Было также показано, что при этом изменяются показатели частотного диапазона variability сердечного ритма (BCP), которые характеризовали смещение ВНС в сторону симпатикотонии [5]. Данные физиологические явления были подкреплены результатами морфологических исследований гиппокампа у крыс. Так, после провокации хирургического воспаления на перегородке носа увеличивается количество темных нейронов и р53-позитивных нейронов [6, 7].

Некоторые параметры временного диапазона BCP также могут характеризовать ответ организма на стрессовые воздействия, описывая баланс вегетативной нервной системы. Так, SDNN отражает преимущественно степень ваготонии [8], rMSSD также характеризует активность парасимпатического отдела ВНС [9], а отношение SDNN к rMSSD может характеризовать вагосимпатическое равновесие [10]. В настоящее время не вполне достаточно данных, описывающих ба-

¹ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

*e-mail: ikastyro@gmail.com



Рис. 1. Схема травматизации перегородки носа у крысы.

ланс вегетативной нервной системы при помощи параметров временного диапазона ВСП после хирургической травматизации перегородки носа.

При воздействии повреждающих факторов активируются симпатическая нервная система и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось и выделяются гормоны и цитокины, облегчающие способность организма справляться со стрессором [11]. Изучение особенностей физиологических стрессовых реакций на биологических объектах при моделировании хирургических вмешательств на перегородке носа обуславливается важностью минимизации развития стрессовых реакций и болевого синдрома у пациентов [12].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить изменения во временном диапазоне variability сердечного ритма и концентрации кортикостерона в плазме крови у крыс после хирургической травматизации перегородки носа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хирургическая травматизация под общим обезболиванием раствором золетила 100 была проведена у 30 половозрелых крыс-самцов линии Wistar массой 210–290 г (рис. 1).

Эксперименты с животными были одобрены биоэтическим комитетом ФГАОУ ВО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, протокол заседания № 6 от 16.02.2021. В день операции до травмы и в течение первых 6 дней после нее проводили контрольную запись ЭКГ в течение 15 мин на исследовательском полиграфе Вiorac M30-B (California, USA). При этом крысы находились в свободном состоянии. Записи ЭКГ обрабатывали программе Вiorack student lab 4.1. Средняя длина обрабатываемых отрезков ЭКГ составила 115 ± 22 с. Для анализа временного диапазона ВСП интервалы ЭКГ без артефактов обрабатывали в программе Kubios HRV, откуда получали значения следующих величин: стандартное отклонение R-R-интервалов (SDNN, мс^2) между нормальными комплексами QRS, квадратный корень из суммы квадратов разности величин последовательных пар нормальных R-R-интервалов (rMSSD, мс^2),

отношение SDNN/rMSSD и общую силу (Total power, мс^2). Для анализа плазмы крови на концентрацию кортикостерона у крыс проводился забор крови после проведения записи ЭКГ из хвостовой вены до операции, в момент операции, через 1–6 сут после операции. Полученную незамедлительно кровь центрифугировали и образцы хранили при -20°C до момента анализа. Концентрацию кортикостерона в плазме (нг/мл) определяли количественно с помощью ELISA, используя набор для иммуноферментного анализа кортикостерона (Assay Designs Inc., Ann Arbor, Mich., США). Данные обрабатывались в программном обеспечении Microsoft Exel, MATLAB, STATISTICA 12.6, JASP 0.14.0.0. При сопоставлении данных группы до и после операции применялся критерий Вилкоксона. Для каждого сравнения определялся свой уровень значимости ($p < 0.001$ до 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По сравнению с контролем, SDNN достоверно увеличилось на 2-е и 3-и сутки после моделирования септопластики ($p < 0.001$), но снизилось на 4–5-й ($p < 0.001$) и 6-й дни ($p < 0.01$). На 2–3-й дни постоперационного периода произошло достоверное снижение SDNN, по сравнению с 1-м днем ($p < 0.01$). Однако на 4–6-й дни произошло его достоверное снижение ($p < 0.001$), по сравнению с предыдущим периодом наблюдения (рис. 2а). RMSSD, по сравнению с контрольными данными, через сутки после операции достоверно увеличился ($p < 0.01$), но на 2–5-е ($p < 0.001$) и 6-е ($p < 0.01$) сутки он был достоверно ниже нормы. Динамика изменений rMSSD имела волнообразный характер с двумя неравномерными пиками на 1-й и 6-й дни (рис. 2б) септопластики ($p < 0.001$). По сравнению с 1-м днем послеоперационного периода, на 2-й день отметился рост отношения STDNN/rMSSD ($p < 0.001$). На третий день оно также продолжило расти ($p < 0.05$), на 4-й день снизилось ($p < 0.01$), по сравнению с предыдущими сутками, и продолжило достоверно снижаться только на 6-й день после операции ($p < 0.05$) (рис. 2в). Оценка общей мощности ВСП показала, что моделирование септопластики привело к ее достоверному снижению на всем сроке постоперационного периода ($p < 0.001$), кроме 3-го дня, когда достоверной разницы, по сравнению с контролем, выявлено не было. Рост показателя общей мощности пришелся на 3-й день после операции ($p < 0.01$), после чего произошел вновь его спад ($p < 0.01$) (рис. 2г).

При этом на 4-й день было зафиксировано его минимальное среднее значение за весь период наблюдения после моделирования септопластики. SDNN/rMSSD, по сравнению с дооперационными величинами, было достоверно выше на 2–

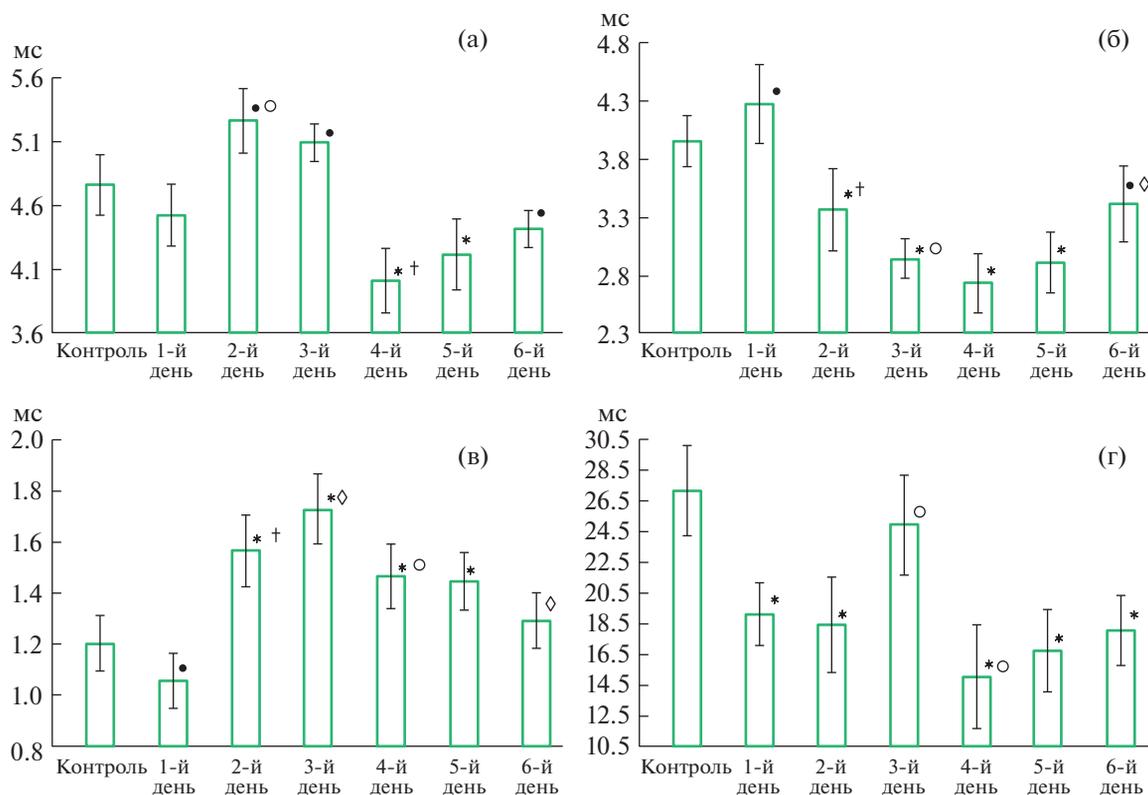


Рис. 2. Изменения ВСП после моделирования септопластики во временном спектре: а — стандартное отклонение R-R-интервалов (SDNN) между нормальными комплексами QRS; б — gMSSD (квадратный корень из суммы квадратов разности величин последовательных пар нормальных R-R-интервалов); в — отношение SDNN/gMSSD; г — общая мощность. Примечание: * — достоверное различие между дооперационными данными (контроль) и данными после операции при $p < 0.001$; • — достоверное различие между дооперационными данными (контроль) и данными после операции при $p < 0.01$; † — достоверное различие между сроками наблюдения после операции при $p < 0.001$; ◯ — достоверное различие между сроками наблюдения после операции при $p < 0.01$; ◊ — достоверное различие между сроками наблюдения после операции при $p < 0.05$.

5-й дни ($p < 0.001$), а значительно ниже — через день после моделирования.

Согласно критерию Вилкоксона, в момент моделирования септопластики и на всем постоперационном периоде концентрация кортикостерона в плазме крови у крыс была достоверно выше, чем до нее ($p < 0.001$). Максимальный уровень гормона коркового вещества надпочечников был отмечен в момент проведения самой операции, через сутки его концентрация значимо снизилась ($p < 0.001$), а со 2-го по 4-й постоперационный день было определено его плато (рис. 3). Но с 5-го дня концентрация кортикостерона в плазме крови у крыс продолжила снижаться ($p < 0.01$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Считается, что SDNN является мерой общей мощности ВСП и чувствителен как к симпатической, так и к парасимпатической импульсации, однако, он в большей степени отражает парасимпатический тонус [8]. Низкая общая ВСП, опре-

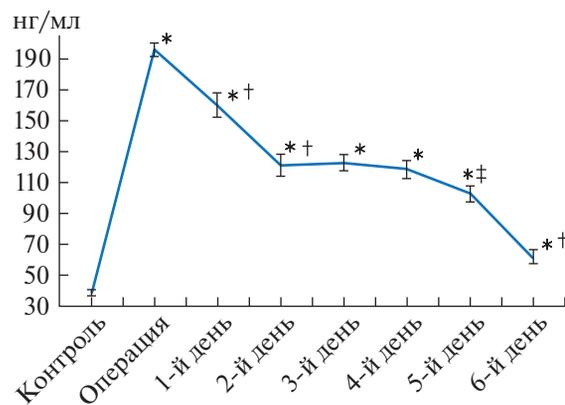


Рис. 3. Динамика изменений концентрации кортикостерона в плазме крови у крыс до и после проведения моделирования септопластики. Примечание: * — достоверные различия между дооперационными данными (контроль) и данными после операции при $p < 0.001$; † — достоверное различие между сроками наблюдения после операции при $p < 0.001$; ‡ — достоверное различие между сроками наблюдения после операции при $p < 0.01$.

деляемая низкими значениями SDNN, отражает снижение парасимпатической и/или повышение симпатической активности [13]. Так, ранее было показано, что повышение значений SDNN соответствовало высокой активности блуждающего нерва [14].

RMSSD характеризует активность парасимпатического отдела ВНС [9]. В нашем исследовании наибольшие значения rMSSD наблюдались через 1 сут после операции, что можно объяснить нарушением нормальных адаптивных процессов, так как в условиях стресса в нормальных превалирует тонус симпатической нервной системы наряду с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [11]. Данные результаты согласуются с падением общей мощности ВСР в первые два дня после операции, что также может свидетельствовать о срыве адаптивных реакций в ответ на повреждение перегородки носа и последующей сенсорной депривации периферического отдела обонятельного анализатора [4].

Отношение SDNN к rMSSD может характеризовать вагосимпатическое равновесие [10]. Так, более высокий SDNN/rMSSD, к примеру при фибромиалгии, по сравнению со здоровыми людьми, характеризует сдвиг баланса ВНС в сторону симпатического компонента, что согласуется с другими исследованиями [15]. Снижение SDNN/rMSSD подтверждает мысль о том, что в первые сутки после моделирования септопластики у крыс развиваются реакции дизадаптации, которые проявляются повышением активности парасимпатической нервной системы на фоне роста кортикостерона, а также снижением активности крыс в открытом поле [5], а в последующий постоперационный период ответная реакция организма на хирургический стресс характеризуется повышением активности симпатической нервной системы с ростом общей мощности в период 2–4 сут, с пиком на третий день, что совпадает с максимальными изменениями цитоархитектоники пирамидного слоя гиппокампа практически во всех его субполях [6, 7], а также с формированием “плато” на графике концентрации кортикостерона (рис. 3).

В настоящем исследовании увеличение rMSSD и снижение SDNN/rMSSD не соответствовали изменениям SDNN как показателя тонуса парасимпатической нервной системы. Показанные изменения SDNN отражали влияние в том числе и симпатикотонии. Так, снижение уровня SDNN и снижение концентрации кортикостерона в крови у крыс в первый день после операции свидетельствовали о снижении тонуса симпатического отдела ВНС [16], первый пик которого, судя по данным кортикостерона, пришелся на день операции, повышение SDNN на 2–3-й дни и снижение уровня кортикостерона с формированием

“плато” могли соответствовать второй волне активации симпатической нервной и симпато-адреналовой систем [17], что подтверждается снижением мощности rMSSD и ростом SDNN/rMSSD в этот период.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрация кортикостерона в плазме крови, SDNN/rMSSD и общая мощность ВСР наиболее точно характеризуют развивающиеся ответные реакции организма в условиях травмы перегородки носа у крыс и могут служить индикаторами хирургического стресса. В то время как SDNN не может являться надежным критерием ваготонии в тех же условиях. Таким образом, хирургическая травма в челюстно-лицевой области у крыс приводит к развитию дизадаптивных процессов в первые сутки с последующей нормализацией адаптивно-приспособительных процессов в период со второго по четвертый постоперационные дни.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пустовит О.М., Наседкин А.Н., Егоров В.И., Исаев В.М., Исаев Э.В., Морозов И.И. Воздействие ультразвуковой кавитации и фотохромотерапии на процесс репарации слизистой оболочки носа после септопластики и подслизистой вазотомии нижних носовых раковин // Голова и шея/Head and neck. Russian Journal. 2018. V. 6. № 2. P. 20–26.
2. Van Egmond M.M.H.T., Rovers M.M., Hannink G., Hendriks C.T.M., van Heerbeek N. Septoplasty with or without concurrent turbinate surgery versus non-surgical management for nasal obstruction in adults with a deviated septum: a pragmatic, randomised controlled trial. // Lancet. 2019; V. 394. № 10195. P. 314–321.
3. Siegel N.S., Gliklich R.E., Taghizadeh F., Chang Y. Outcomes of septoplasty. // Otolaryngol Head Neck Surg. 2000. V. 122. № 2. P. 228–32.
4. Torshin V., Kastyro I., Kostyaeva M., Popadyuk V., Ermakova N., Surovtsev V., Gushchina Y., Kovalenko A. The effect of destruction of the mucous membrane of the olfactory zone of the nasal septum on the cytoarchitectonics of the pyramidal layer of the hippocampus. // Virchows Archiv. 2020. V. 477. P. 340.
5. Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Torshin V.I., Ermakova N.V., Popadyuk V.I. The Effect of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Behavior in the Open Field and the Autonomic Nervous System of Rats // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2020. V. 492. P. 121–123.
6. Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidulin G.V., Shilin S.S., Torshin V.I., Kostyaeva M.G., Popadyuk V.I., Yunusov T.Y.,

- Shmaevsky P.E., Shalamov K.P., Kupryakova A.D., Doroginskaya E.S., Sedelnikova A.D.* Influence of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Expression of p53 Protein in the Hippocampus of Rats. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 497. P. 99–103.
7. *Koenig J., Thayer J.F.* Sex differences in healthy human heart rate variability: a meta-analysis. // *Neurosci Biobehav Rev*. 2016. V. 64. P. 288–310.
 8. *Sztajzel J.* Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system. // *Swiss Med. Wkly*. 2004. V. 134. P. 514–522.
 9. *Kang J.H., Kim J.K., Hong S.H., Lee C.H., Choi B.Y.* Heart Rate Variability for Quantification of Autonomic Dysfunction in Fibromyalgia. // *Ann. Rehabil. Med*. 2016. V. 40. № 2. P. 301–309.
 10. *Desborough J.P.* The stress response to trauma and surgery. // *Br J Anaesth*. 2000. V. 85. № 1. P. 109–117.
 11. *Kastyro I.V., Torshin V.I., Drozdova G.A., Popadyuk V.I.* Acute pain intensity in men and women after septoplasty // *Russian Open Medical Journal*. 2017. V. 6. № 3. P. 1–6.
 12. *Karri J., Zhang L., Li S., Chen Y.-T., Stampas A., Li S.* Heart Rate Variability: A Novel Modality for Diagnosing Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. // *Front. Physiol*. 2017. V. 8. P. 495.
 13. *Patural H., Pichot V., Flori S., Giraud A., Franco P., Pladys P., Beuchée A., Roche F., Barthelemy J.-C.* Autonomic maturation from birth to 2 years: normative values. // *Heliyon*. 2019. V. 5. P. e01300.
 14. *Pagani M., Lombardi F., Guzzetti S., Sandrone G., Rimoldi O., Malfatto G.* Power spectral density of heart rate variability as an index of sympatho-vagal interaction in normal and hypertensive subjects. // *J. Hypertens Suppl*. 1984. V. 2. P. 383–385.
 15. *Valentino R.J., Foote S.L., Aston-Jones G.* Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. // *Brain research*. 1983. V. 2. № 270. P. 363–367.
 16. *Гостюхина А.А., Самошина Т.А., Сайцев К.В., Гуртор С.С., Жукова О.Б., Светлик М.В., Абдулкина Н.Г., Сайцев А.А.* Адаптивные реакции крыс после световых десинхронозов и физического переутомления. // *Бюллетень сибирской медицины*. 2018. Т. 17. № 3. С. 22–34.

CHANGES IN THE TIME-DOMAIN OF HEART RATE VARIABILITY AND CORTICOSTERONE AFTER SURGICAL TRAUMA TO THE NASAL SEPTUM IN RATS

I. V. Kastyro^{a, #}, V. I. Popadyuk^a, Academician of the RAS I. V. Reshetov^b, M. G. Kostyaeva^a, S. G. Dragunova^a, T. F. Kosyreva^a, G. V. Khamidulin^a, and P. E. Shmaevsky^a

^a Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

The aim of the work was to study changes in the time range of heart rate variability (HRV) against the background of changes in the concentration of corticosterone in blood plasma in rats after surgical trauma to the nasal septum. A septoplasty was simulated in 30 mature male Wistar rats weighing 210–290 g. An ECG was recorded with subsequent analysis of the time domain of HRV, as well as blood sampling for changes in the concentration of corticosterone in the blood plasma. As a result, SDNN significantly increased in comparison with the control on days 2 and 3 ($p < 0.001$), but decreased on days 4–5 ($p < 0.001$) and 6 days ($p < 0.01$). rMSSD changed in waves with two irregular peaks on days 1 and 6. SDNN / rMSSD, in comparison with the 1st day of the postoperative period, increased on the 2nd day and continued to grow ($p < 0.05$), and on the 4th day it began to decrease ($p < 0.01$). The total power of HRV was low throughout the postoperative period ($p < 0.001$), except for the 3rd day, when it was equal to the control data. The increase in the total power indicator fell on the 3rd day after the operation ($p < 0.01$), after which its decline occurred again. The concentration of corticosterone in the blood plasma in rats was significantly higher than before ($p < 0.001$). From the 2nd to the 4th postoperative day, its plateau was determined. Simulation of septoplasty leads to changes in the time range of HRV, an increase in the concentration of corticosterone in the blood plasma in rats with its maximum at the time of surgery and after 24 hours, the formation of a “plateau” from the 2nd to the 4th postoperative days, which coincides with changes of HRV.

Keywords: septoplasty, heart rate variability, corticosterone, stress

УДК 577.2; 577.29; 577.151.45; 577.214.5; 577.216.3; 616-006.6; 616-092.4

ХИМИЧЕСКАЯ ИНДУКЦИЯ ГИПОКСИИ ТРОФОБЛАСТА ХЛОРИДОМ КОБАЛЬТА ПРИВОДИТ К ПОВЫШЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ *DDIT3*

© 2021 г. Е. Н. Князев^{1,2,3,*}, С. Ю. Пауль^{2,4}, член-корреспондент РАН А. Г. Тоневицкий^{1,2}

Поступило 05.04.2021 г.

После доработки 19.04.2021 г.

Принято к публикации 22.04.2021 г.

Клетки хориокарциномы BeWo b30 используются для моделирования гипоксии трофобласта плаценты человека с применением хлорида кобальта (II) и производного оксихинолина (ПО) в качестве химических индукторов фактора, индуцируемого гипоксией (HIF). В данном исследовании было показано, что оба вещества активируют гипоксический путь и эпителиально-мезенхимальный переход и подавляют пути клеточной пролиферации. Однако CoCl_2 вызывал активацию пути апоптоза, что выразилось в повышении активности эффекторных каспаз-3 и 7, и увеличивал экспрессию мишени ответа на несвернутые белки *DDIT3*. При воздействии CoCl_2 активировался путь mTORC1, в то время как ПО подавляло данный путь, как это происходит при реальной гипоксии трофобласта. Таким образом, воздействие CoCl_2 на клетки BeWo b30 может являться моделью более тяжелой гипоксии с активацией апоптоза, а ПО имитирует умеренную гипоксию.

Ключевые слова: плацента, хориокарцинома, BeWo, гипоксия, кобальт, оксихинолин, ответ на несвернутые белки, *DDIT3*, *CHOP*, mTORC1

Список сокращений: HIF – Hypoxia-Inducible Factor, фактор, индуцируемый гипоксией. PHD – prolyl hydroxylases, пролилгидроксилазы. pVHL – von Hippel Lindau protein, белок фон Гиппеля–Линдау. ROS – reactive oxygen species, реактивные формы кислорода. ПО – производное оксихинолина. ЭПР – эндоплазматический ретикулум

DOI: 10.31857/S2686738921040156

При нормальном развитии плаценты на 9–10-й день после оплодотворения клетки цитотрофобласта мигрируют в спиральные артерии матки и замещают эндотелий, формируя сосуды с высоким потоком, устойчивые к действию факторов, регулирующих тонус сосудов. Нарушение инвазии трофобласта в сосуды вследствие гипоксии и других факторов приводит к нарушению кровоснабжения, эндоплазматическому стрессу и повышению апоптоза клеток трофобласта [1].

Изучение биологии плаценты при беременности у людей ограничено по этическим причинам, а плацента после нормальных родов или кесарева

сечения не отражает ранних этапов развития плаценты, важных для патогенеза преэклампсии. Животные модели плаценты отличаются от человеческой как на анатомическом, так и на молекулярном уровне [2]. В связи с этим особое значение приобретают модели плацентарного барьера *in vitro*. Первичные клетки трофобласта человека имеют ограниченный потенциал деления и низкую воспроизводимость результатов при использовании клеток от разных доноров. Использование иммортализованных клеточных линий, имитирующих нормальный трофобласт, таких как линия хориокарциномы человека BeWo b30, позволяет достичь лучшей воспроизводимости, а применение внеклеточного матрикса и микрофлюидных устройств для имитации естественного микроокружения и кровотока еще больше приближает модели *in vitro* к физиологическим условиям [3].

Центральным звеном активации гипоксического пути является накопление индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа (HIF-1 α). При нормоксии HIF-1 α гидроксилируется HIF-пролилгидроксилазами (PHD), что создает условия для присоединения белка фон Гиппеля–Линдау (pVHL) и запуска убиквитинирования и проте-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

³ Центр трансляционных технологий, Москва, Россия

⁴ Троицкий инженерный центр, Москва, Россия

*e-mail: knyazevevg@gmail.com

Таблица 1. Метаболическая активность и апоптоз в клетках BeWo b30

Показатель	Контроль	ПО	CoCl ₂
Метаболическая активность по МТТ-тесту, %	100 ± 5	81 ± 4*	82 ± 5*
Активность каспазы-3 и 7, %	100 ± 17	147 ± 11*	213 ± 11*

* $p < 0.05$.

асомной деградации HIF-1 α [4]. В условиях гипоксии активность РНД подавляется, уровень HIF-1 α повышается, происходит его транслокация в ядро и гетеродимеризация с конститутивно4й субъединицей HIF-1 β , что вызывает транскрипцию генов-мишеней [5].

Индукция гипоксии с помощью CoCl₂ достигается за счет замещения ионов Fe²⁺ в активном центре РНД на ионы Co²⁺. Также CoCl₂ вызывает окисление аскорбатов, являющихся важными кофакторами РНД, связывается с HIF-1 α , препятствуя взаимодействию с pVHL, и ингибирует аспарагинилгидроксилазу FIN, ингибирующую HIF. Более подробно механизмы действия CoCl₂ описаны в обзоре [6]. Следует отметить, что гены, экспрессия которых изменяется при действии CoCl₂, лишь частично пересекаются с таковыми при дефиците кислорода, что может объясняться действием CoCl₂ на другие ферменты и сигнальные пути клетки [7] и ставит под вопрос релевантность данной модели гипоксии.

Ранее было показано, что для химического моделирования гипоксии также могут использовать производные оксихинолина (ПО), которые связываются с ионом Fe²⁺ в активном центре РНД, но не других известных ферментов этого семейства, что приводит к ингибированию гидроксирования HIF-1 α , его накоплению в клетке и активации гипоксийного пути [8]. Заместители в 7 положении ПО имитируют структуру домена HIF-1 α , контактирующего с активным центром РНД, что обеспечивает специфичное связывание с этими ферментами и уменьшает число побочных эффектов по сравнению с использованием CoCl₂ [9, 10].

Целью данного исследования являлось сравнение изменений в клетках на уровне транскриптома при воздействии CoCl₂ и ПО на клетки хориокарциномы BeWo b30.

Клетки хориокарциномы BeWo b30 выращивались в 6-луночных планшетах в среде DMEM с L-глутамином и содержанием глюкозы 4.5 г/л с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки One Shot, 1% 100x MEM NEAA и 1% 100x Pen Strep. При достижении 80% конфлюэнтности клеточная среда заменялась на среду, содержащую 300 мкМ CoCl₂ или 5 мкМ ПО 4896–3212. В контрольных условиях производилась замена на свежую культуральную среду. Спустя 24 ч произ-

водилась оценка метаболической активности клеток МТТ-тестом, а также активности каспазы-3 и 7 как показатель эффекторной фазы апоптоза набором реагентов Abcam Caspase-3 Assay Kit.

Выделение тотальной РНК проводили методом гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [11] с помощью набора реагентов Qiagen miRNeasy Mini Kit. Концентрация РНК определялась на приборе NanoDrop 1000 [12]. Качество РНК оценивалось на приборе Bio-Rad Experion по значению RQI [13].

Секвенирование следующего поколения производилось на приборе Illumina NextSeq 500 с подготовкой библиотек набором Illumina Stranded mRNA Library Prep Kit. Изменение экспрессии генов считалось достоверным при кратности различий более 2.0 и p -значении для t -критерий Стьюдента с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественность сравнений менее 0.05 [14]. Были определены активированные и подавленные сигнальные пути с использованием коллекции MSigDB.

Тяжелая гипоксия, окислительный стресс при действии реактивных форм кислорода (ROS) и эндоплазматический стресс могут вызывать активацию внутреннего сигнального пути апоптоза. Эффекторная фаза апоптоза связана с активацией каспаз-3 и 7, обуславливающих основные процессы апоптотической трансформации клеток [15]. Относительная активность каспазы-3 и 7 представлена в табл. 1 вместе с метаболической активностью по МТТ-тесту. Из полученных данных можно сделать вывод, что при воздействии CoCl₂ сильнее выражена активация апоптоза в клетках, что имитирует более тяжелую гипоксию трофобласта по сравнению с ПО. Отсутствие различий в результатах МТТ-теста между двумя воздействиями свидетельствует, что оба вещества практически не оказывают значимого влияния на активность митохондрий клеток как реакцию на активацию гипоксического пути.

Воздействие CoCl₂ на клетки BeWo b30 в течение 24 ч привело к статистически значимому изменению более чем в 2 раза экспрессии 3030 генов, а при воздействии ПО – 1030 генов, при этом экспрессия 287 генов изменялась однонаправленно при обоих условиях. При обоих типах воздействия был активирован гипоксический путь и эпителиально-мезенхимальный переход и подавлена активность путей, связанных с транскрип-

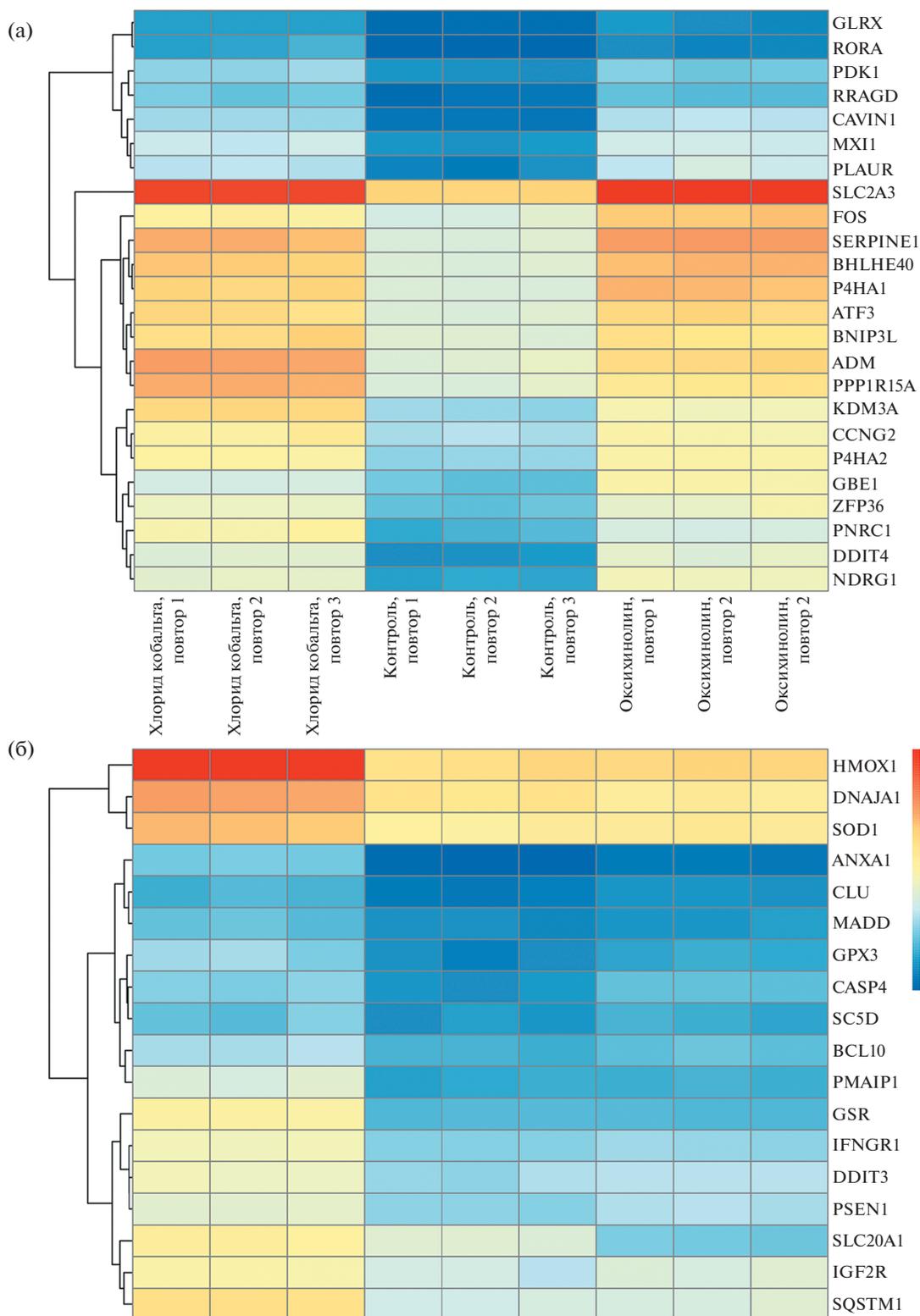


Рис. 1. Экспрессия генов, относящихся к сигнальному пути гипоксии (а) и апоптоза (б) в контроле и при воздействии ПО и $CoCl_2$.

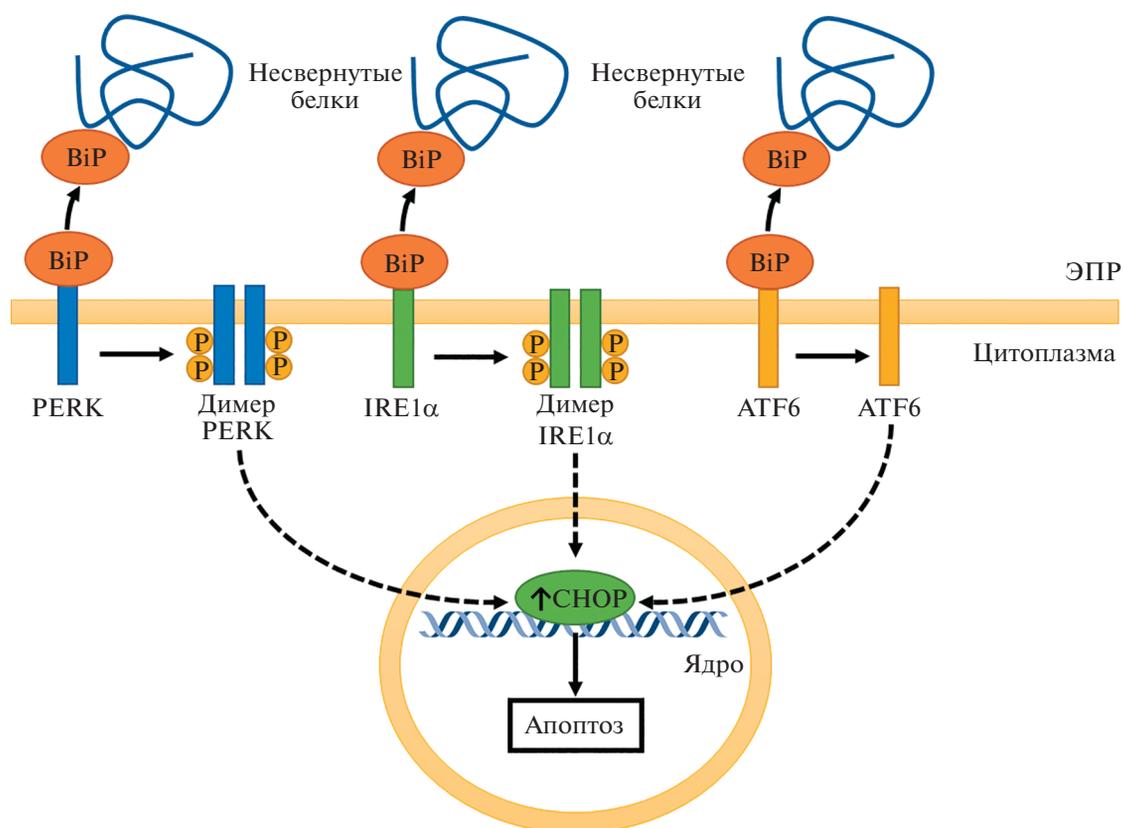


Рис. 2. Сигнальный путь ответа на несвернутые белки при имитации гипоксии CoCl_2 . Несвернутые белки в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) связываются с белком BiP, что высвобождает белки PERK, IRE1 α и ATF6. Все три ветви данного пути направлены на компенсацию эндоплазматического стресса, однако при срыве адаптации повышают экспрессию проапоптотического фактора транскрипции CHOP.

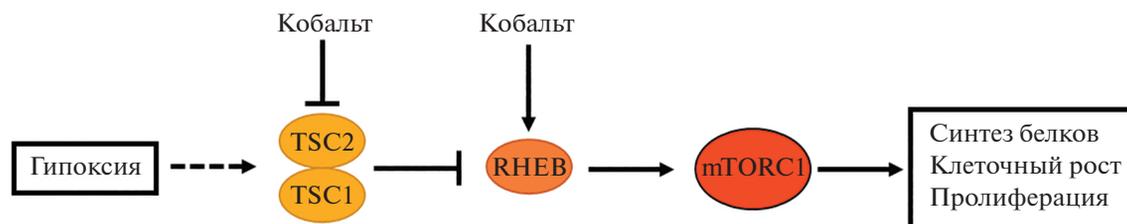


Рис. 3. Сигнальный путь mTORC1 при гипоксии. Гипоксия увеличивает активность комплекса TSC1/TSC2, инактивирующего белок RHEB, что приводит к подавлению активности mTORC1. При действии CoCl_2 понижена экспрессия TSC2 и повышена экспрессия RHEB, что может объяснять активацию пути mTORC1.

ционными факторами семейства E2F и контрольной точкой G2M, т.е. путей клеточной пролиферации. Это совпадает с эффектами гипоксии на плаценту *in vivo*: активация HIF-1 α в клетках трофобласта подавляет деление и стимулирует клеточную подвижность, что приводит к миграции клеток трофобласта и их инвазии в маточные сосуды [1].

На рис. 1а представлены профили экспрессии генов пути гипоксии в образцах контрольных клеток и при воздействии ПО и CoCl_2 , свидетель-

ствующие об активации одинаковых мишеней HIF-1 α . При анализе генов, экспрессия которых достоверно изменилась уникально для воздействия CoCl_2 , выявлена активация пути апоптоза и ответа на ROS. Это подтверждает данные, что кобальт может вызывать накопление ROS, вызывая повреждение ДНК и приводя к апоптозу [16].

При этом среди генов, экспрессия которых изменилась только при воздействии ПО, активация данных путей не наблюдалась. На рис. 1в представлена экспрессия генов пути апоптоза, свиде-

тельствующая, что картина в контроле и при воздействии ПО практически не отличается, в то время как кобальт вызывает значимую активацию данного пути.

Гипоксия, сопровождающаяся образованием ROS и цитоплазматическим стрессом, приводит к нарушению правильного свертывания белков и активации пути ответа на несвернутые белки. Данный путь приводит к адаптации клетки к гипоксии, однако тяжелая гипоксия, превышающая компенсаторные возможности клетки, приводит через указанный путь к накоплению фактора транскрипции СНОР, кодируемого геном *DDIT3*, запускающего апоптоз [17]. При воздействии ПО экспрессия *DDIT3* значимо не изменялась, однако действие CoCl_2 повышало экспрессию *DDIT3* в 3.9 раза ($p < 0.001$). На рис. 2 изображена упрощенная схема пути ответа на несвернутые белки и отмечено повышение экспрессии СНОР, обнаруженное в нашем исследовании. По-видимому, воздействие CoCl_2 имитирует более тяжелую форму гипоксии по сравнению с ПО. Было показано, что другое ПО, известное под названием адаптахин, препятствует активации апоптоза через ветвь ответа на несвернутые белки PERK/ATF4/СНОР [18], что согласуется с нашими наблюдениями.

При анализе генов, экспрессия которых достоверно изменилась уникально для воздействия ПО, выявлено снижение окислительного фосфорилирования, что является нормальной реакцией клеток трофобласта при переходе от аэробного к анаэробному метаболизму при гипоксии [19].

Следует особо отметить, что по результатам анализа сигнальных путей в клетках BeWo b30 при воздействии ПО происходит подавление сигнального пути mTORC1, а при воздействии CoCl_2 — его активация. Известно, что гипоксия подавляет сигнальный путь mTORC1 [20]. При воздействии CoCl_2 в 1.9 раза выросла экспрессия гена *RHEB* и в 2.5 раза упала экспрессия гена *TSC2*, в то время как при воздействии ПО экспрессия этих генов достоверно не изменялась, что может объяснять активацию пути mTORC1 при воздействии CoCl_2 в отличие от ПО.

На рис. 3 изображена упрощенная схема одного из механизмов контроля пути mTORC1 и отмечено выявленное воздействие CoCl_2 на гены *TSC2* и *RHEB*.

Таким образом, сравнение двух химических моделей гипоксии, воздействия ПО и CoCl_2 , выявило активацию в трофобласте сигнального пути гипоксии и эпителиально-мезенхимального перехода и подавление клеточной пролиферации при обоих воздействиях, однако воздействие кобальта активировало гены, вовлеченные в сигнальный путь апоптоза, и более выраженно уси-

ливалось активность каспазы-3 и 7 в сравнении с контрольными условиями и воздействием ПО. CoCl_2 активировал путь ответа на несвернутые белки и mTORC1, а ПО подавляло путь mTORC1. Все это указывает на то, что модель химической гипоксии с использованием ПО отражает воздействие умеренной гипоксии на клетки трофобласта, в то время как воздействие CoCl_2 является повреждающим воздействием, сопровождающимся выраженным апоптозом. С клинической точки зрения различия в активации сигнальных путей при умеренной и тяжелой гипоксии могут означать необходимость разных подходов к лечению этих состояний. Апоптоз и нарушение инвазии трофобласта в сосуды матери при тяжелой гипоксии могут являться предпосылкой к развитию тяжелого осложнения беременности, преэклампсии [1]. Активация HIF-1 α с помощью ПО может запускать в клетках антигипоксический ответ, подготавливая клетку к реакции на тяжелую гипоксию, что оказывает нейропротекторный эффект при инсульте и используется при лечении анемии, связанной с почечной недостаточностью [9]. Полученные результаты создают предпосылки для разработки подходов к профилактике развития гипоксических осложнений беременности.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00145).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rana S., Lemoine E., Granger J.P., et al. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives // *Circ. Res.* 2019. V. 124. № 7. P. 1094–1112.
2. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Impedance Spectroscopy and Transcriptome Analysis of Choriocarcinoma BeWo b30 as a Model of Human Placenta // *Mol. Biol.* 2019. V. 53. № 3. P. 411–418.
3. Samatov T.R., Shkurnikov M.U., Tonevitskaya S.A., et al. Modelling the metastatic cascade by in vitro microfluidic platforms // *Prog. Histochem. Cytochem.* 2015. V. 49. № 4. P. 21–29.
4. Ohh M., Park C.W., Ivan M., et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel–Lindau protein // *Nat. Cell Biol.* 2000. V. 2. № 7. P. 423–427.
5. Maxwell P. Activation of the HIF pathway in cancer // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001. V. 11. № 3. P. 293–299.
6. Muñoz-Sánchez J., Cháñez-Cárdenas M.E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model // *J. Appl. Toxicol.* 2019. V. 39. № 4. P. 556–570.
7. Lendahl U., Lee K.L., Yang H., et al. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. № 12. P. 821–832.
8. Poloznikov A.A., Khristichenko A.Y., Smirnova N.A., et al. Structural optimization of adaptaquin, a HIF prolyl

- hydroxylase inhibitor // *Russ. Chem. Bull.* 2019. V. 68. № 1. P. 168–173.
9. *Poloznikov A.A., Nikulin S.V., Zakhariants A.A., et al.* “Branched Tail” Oxyquinoline Inhibitors of HIF Prolyl Hydroxylase: Early Evaluation of Toxicity and Metabolism Using Liver-on-a-chip // *Drug Metab. Lett.* 2019. V. 13. № 1. P. 45–52.
 10. *Poloznikov A.A., Zakhariants A.A., Nikulin S.V., et al.* Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: Effect of modifications to phenylacetamide ‘tail’ // *Biochimie.* 2017. V. 133. P. 74–79.
 11. *Shkurnikov M.Y., Makarova Y.A., Knyazev E.N., et al.* Profile of microRNA in Blood Plasma of Healthy Humans // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 160. № 5. P. 632–634.
 12. *Fomicheva K.A., Osip'yants A.I., Knyazev E.N., et al.* Detection of Potential Metastatic Prostate Cancer Circulating Biomarkers by Comparison of miRNA Profiles in DU145 Cells and Culture Medium. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 6. P. 792–796.
 13. *Shkurnikov M.Y., Knyazev E.N., Wicklein D., et al.* Role of L1CAM in the Regulation of the Canonical Wnt Pathway and Class I MAGE Genes // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 160. № 6. P. 807–810.
 14. *Osip'yants A.I., Knyazev E.N., Galatenko A.V., et al.* Changes in the Level of Circulating hsa-miR-297 and hsa-miR-19b-3p miRNA Are Associated with Generalization of Prostate Cancer // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 3. P. 379–382.
 15. *Sendoel A., Hengartner M.O.* Apoptotic Cell Death Under Hypoxia // *Physiology.* 2014. V. 29. № 3. P. 168–176.
 16. *Simonsen L.O., Harbak H., Bennekou P.* Cobalt metabolism and toxicology—A brief update // *Sci. Total Environ.* 2012. V. 432. P. 210–215.
 17. *Bartoszewska S., Collawn J.F.* Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2020. V. 25. № 1. P. 18.
 18. *Aimé P., Karuppagounder S.S., Rao A., et al.* The drug adaptaquin blocks ATF4/CHOP-dependent pro-death Trib3 induction and protects in cellular and mouse models of Parkinson’s disease // *Neurobiol. Dis.* 2020. V. 136. P. 104725.
 19. *Illsley N.P., Caniggia I., Zamudio S.* Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? // *Int. J. Dev. Biol.* 2010. V. 54. № 2–3. P. 409–419.
 20. *Wouters B.G., Koritzinsky M.* Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2008. V. 8. № 11. P. 851–864.

CHEMICAL INDUCTION OF TROPHOBLAST HYPOXIA BY COBALT CHLORIDE LEADS TO INCREASED EXPRESSION OF *DDIT3*

E. N. Knyazev^{a,b,c,#}, S. Yu. Paul^{b,d}, and Corresponding Member of the RAS A. G. Tonevitsky^{a,b}

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

^b *Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*

^c *Translational Technology Center, Moscow, Russian Federation*

^d *Troitsk Research and Development Center, Moscow, Russian Federation*

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

Choriocarcinoma cells BeWo b30 are used to model human placental trophoblast hypoxia using cobalt (II) chloride and oxyquinoline derivative (OD) as chemical inducers of hypoxia-inducible factor (HIF). In this study, it was shown that both substances activate the hypoxic pathway and the epithelial-mesenchymal transition and inhibit the pathways of cell proliferation. However, CoCl₂ caused activation of the apoptosis pathway, increased the activity of effector caspases-3 and 7, and increased the expression of the unfolded protein response target *DDIT3*. The mTORC1 pathway was activated upon exposition to CoCl₂, while OD suppressed this pathway, as it happens during real trophoblast hypoxia. Thus, CoCl₂ can be a model of severe hypoxia with activation of apoptosis, while OD mimics moderate hypoxia.

Keywords: placenta, choriocarcinoma, BeWo, hypoxia, cobalt, oxyquinoline, unfolded protein response, *DDIT3*, CHOP, mTORC1

УДК 575.22:595.773.4

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ К ГОМОДИМЕРИЗАЦИИ N-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ С КЛАСТЕРАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. Д. В. Фурсенко¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. Н. Бончук^{1,*}

Поступило 31.03.2021 г.

После доработки 20.04.2021 г.

Принято к публикации 22.04.2021 г.

СТСФ принадлежит к большому семейству транскрипционных факторов, имеющих кластеры доменов цинковых пальцев С2Н2 типа (С2Н2 белки), и является основным архитектурным белком млекопитающих. На N-конце СТСФ человека находится гомодимеризующийся неструктурированный домен, который может участвовать в организации дистанционных взаимодействий. Для исследования существования аналогичных N-концевых доменов у других С2Н2 белков человека была использована дрожжевая двугибридная система. В общей сложности способность неструктурированных N-концевых доменов к гомодимеризации была исследована для шести С2Н2 белков человека, имеющих сходный с СТСФ профиль экспрессии. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии способности к гомодимеризации у выбранных участков. С другой стороны, три С2Н2 белка, содержащие на N-конце структурированный DUF3669 домен в дрожжевой двугибридной системе, демонстрируют способность как к гомо-, так и к гетеродимеризации.

Ключевые слова: цинковые пальцы С2Н2 типа, гомодимеризация, DUF3669 домен, белки с цинковыми пальцами, факторы транскрипции

DOI: 10.31857/S2686738921040090

СТСФ, наиболее изученный архитектурный белок млекопитающих, состоит из неструктурированных концевых областей и расположенного в центральной части кластера из 11 цинковых пальцев С2Н2 типа (С2Н2 домены) [1]. В составе СТСФ человека 3–7 С2Н2 домены отвечают за специфичное связывание с консенсусной последовательностью длиной 15 п.н. [2]. Кластер С2Н2 доменов – единственная консервативная часть белка СТСФ, имеющая высокий уровень гомологии у большей части позвоночных, насекомых и некоторых нематод [3]. Белки с кластерами из 5 и более С2Н2 доменов (С2Н2 белки) обладают способностью к специфическому узнаванию протяженных последовательностей ДНК и у разных таксонов составляют значительную часть ДНК связывающих транскрипционных факторов, функции которых остаются до настоящего времени слабо исследованными [1, 4].

Среди порядка 170 С2Н2 белков дрозофилы многие выполняют архитектурную функцию,

поддерживая дистанционные взаимодействия. У большинства, помимо кластера С2Н2 доменов, на N-конце имеются структурированные домены, способные к специфичной гомодимеризации [5]. Было показано, что гомодимеризация N-доменов у таких белков необходима для поддержания дистанционных взаимодействий [4, 6]. Мы предполагаем, что доля С2Н2 белков млекопитающих, выполняющих архитектурную функцию, гораздо больше, чем принято считать сейчас, и что механизм поддержания дистанционных взаимодействий принципиально не отличается между млекопитающими и насекомыми. Однако только сравнительно небольшая часть С2Н2 белков млекопитающих содержит структурированные N-концевые домены SCAN или VTB, способные к гомодимеризации [4]. VTB домены формируют преимущественно стабильные гомодимеры [7], в то время как для SCAN доменов была показана способность к гомодимеризации и выборочной гетеродимеризации [8]. Для еще одного малоизученного домена, DUF3669, была выборочно показана способность к гомо- и гетеродимеризации [9].

Отсутствие охарактеризованных димеризующих N-концевых доменов у С2Н2 белков млекопитающих можно объяснить способностью не-

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

*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru

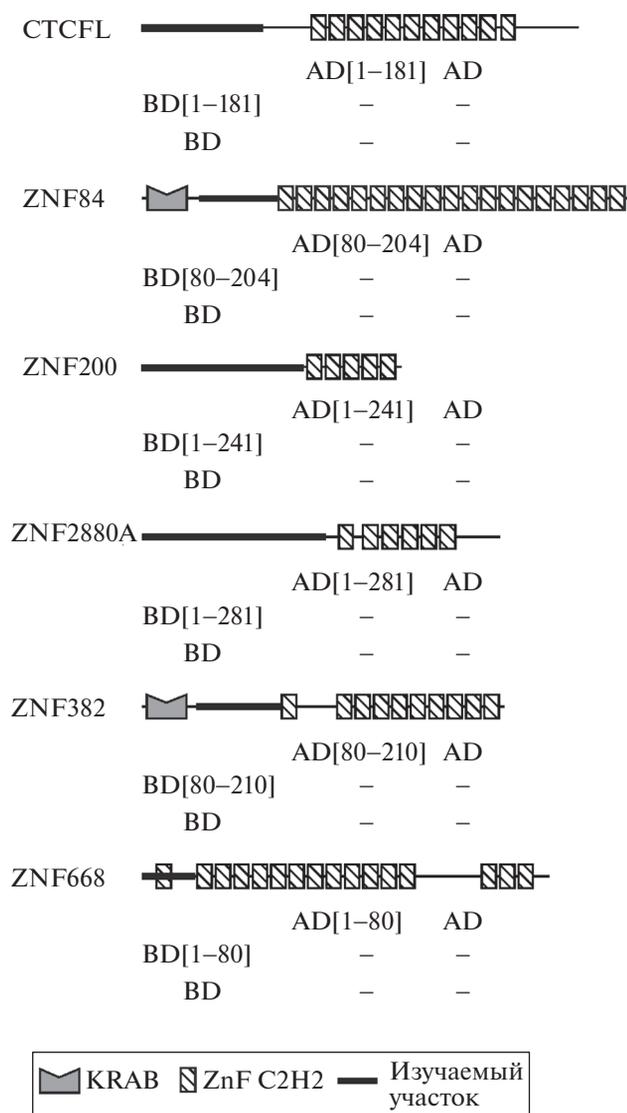


Рис. 1. Исследование способности к гомодимеризации N-концевых участков C2H2-содержащих белков человека в дрожжевой двугибридной системе. Для проверки способности к гомодимеризации наблюдали способность к росту на селективной среде дрожжей, коэкспрессирующих N-концевой участок, соединенный с ДНК-связывающим доменом GAL4 (BD) или с активационным доменом GAL4 (AD). На схеме доменной структуры белков исследованный участок обозначен толстой линией, ниже указаны соответствующие номера аминокислотных остатков. Ниже представлены результаты дрожжевой двугибридной системы, где + и - означают наличие или отсутствие взаимодействия между соответствующими конструкциями. В качестве положительного контроля использовалась способность к гомодимеризации N-конца белка CTCF человека (1-264 а.к.), а в качестве отрицательного контроля - тестирование на наличие взаимодействия только с активационным (AD) или ДНК-связывающим (BD) доменом белка GAL4. KRAB - Krüppel associated box домен, ZnF C2H2 - домен цинковых пальцев C2H2-типа.

структурированных доменов к олигомеризации, как было нами показано для основного архитектурного белка человека CTCF и его ортологов [10]. С целью проверки этого предположения были выбраны шесть C2H2 белков, которые имеют паттерн экспрессии, похожий на таковой для белка CTCF (рис. 1). Также в анализ были взяты три C2H2 белка с N-концевым DUF3669 доменом, для более полной характеристики димеризующей способности данного домена (рис. 2а).

Исследование способности N-концевых доменов к гомодимеризации было проведено с использованием дрожжевой двугибридной системы. Ранее данный метод позволил идентифицировать способность к гомодимеризации неструктурированного N-концевого участка белка CTCF разных видов животных [10]. В отличие от неструктурированного N-концевого домена CTCF человека, димеризация которого служила положительным контролем в данном эксперименте, не было обнаружено взаимодействия N-концевых участков белков ZNF84, ZNF200, ZNF280A, ZNF382, ZNF668, а также CTCFL, паралога CTCF (рис. 1). Последний результат представляет особый интерес, поскольку CTCFL имеет значительное сходство с CTCF в структуре цинковых пальцев и может связывать его сайты, однако экспрессируется преимущественно в семенниках млекопитающих [11]. Предполагается, что CTCFL участвует в регуляции архитектурных функций CTCF, подменяя его в определенных случаях на сайтах и тем самым нарушая формирование хроматиновых петель.

У человека предсказано 7 белков, имеющих DUF3669 домен, однако только у трех из них (ZNF282, ZNF398 и ZNF777) на C-конце есть кластер из 5 и более цинковых пальцев C2H2-типа (рис. 2а, слева). Данные белки находятся в одном кластере в геноме человека и многих других видов животных, а аминокислотная последовательность самого домена DUF3669 этих белков у человека имеет высокую степень гомологии (рис. 2б). Помимо высокой степени сходства, в дрожжевой двугибридной системе домен DUF3669 у всех взятых в работу C2H2 белков способен не только к гомо-, но и к гетеродимеризации (рис. 2а, справа).

Наличие способности к специфическому связыванию длинных мотивов ДНК и к гомодимеризации являются отличительными свойствами архитектурных белков дрозофилы. У млекопитающих из ~800 C2H2 белков лишь 84 имеют димеризующие SCAN или VTB домены [1]. В нашей работе мы подтвердили и показали, что малоизученный N-концевой домен DUF3669 так же способен к образованию гомо- и гетеро- димеров у трех C2H2 белков человека. Согласно модели, разработанной на дрозофиле, предполагается,

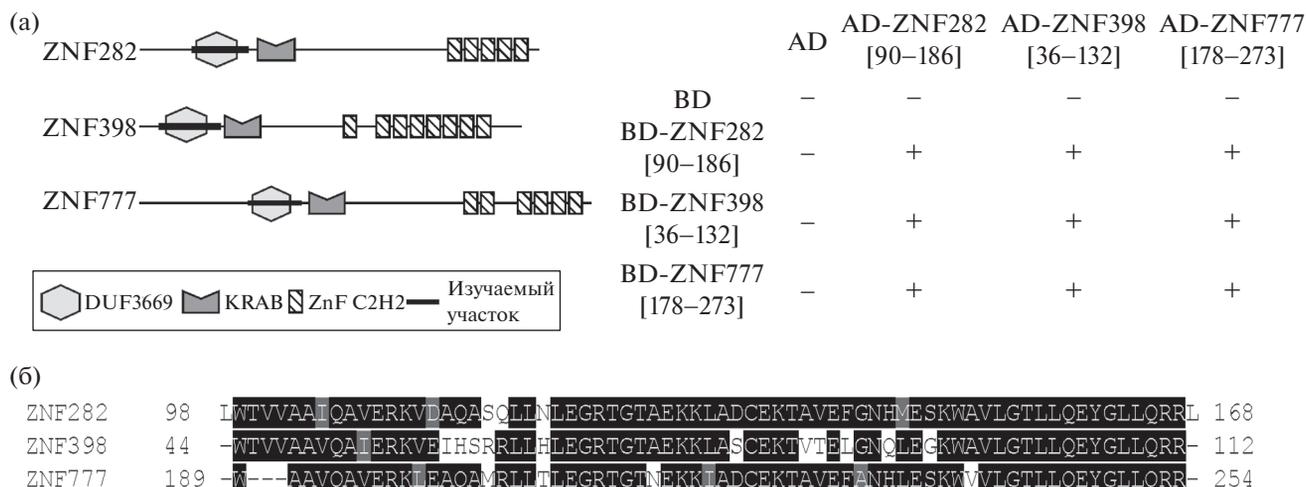


Рис. 2. (а) Доменные структуры DUF3669-содержащих белков (слева) и результаты дрожжевой двугибридной системы (справа). Результаты представлены аналогично рис. 1. AD – активационный домен, BD – ДНК-связывающий домен. (б) Выравнивание аминокислотных последовательностей доменов DUF3669 белков ZNF282, ZNF398, ZNF777 человека. DUF3669 – домен с неизвестной функцией 3669, KRAB – Krüppel associated box домен, ZnF C2H2 – домен цинковых пальцев C2H2-типа.

что большая часть C2H2 белков участвует в организации архитектуры хромосом. Преимущественная гомодимеризация N-концевых доменов C2H2 белков дрозофилы является ключевой в организации специфичных дистанционных взаимодействий [12]. Однако среди C2H2 белков человека димеризация N-концевых доменов имеет незначительное распространение по сравнению с аналогичными белками дрозофилы [4]. Также результаты нашей работы не подтверждают предположения, что среди C2H2 белков человека широко распространена гомодимеризация за счет неструктурированного N-концевого участка. Стоит отметить, что у наиболее исследованного архитектурного/инсуляторного белка дрозофилы Su(Hw) на N-конце также не было обнаружено домена, способного к гомодимеризации [13]. Возможно, но слабо исследованным, механизмом гомодимеризации для таких белков может являться участие самих C2H2 доменов в этом процессе. Так, было показано, что белок YY1 человека гомодимеризуется с участием C2H2 доменов [14]. Таким образом, требуется дальнейшее изучение механизмов формирования гомодимеров у C2H2 белков человека.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максименко О.Г., Фурсенко Д.В., Белова Е.В. и др. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 1. P. 80–95.

2. Hashimoto H., Wang D., Horton J.R., et al. // Mol. Cell. 2017. V. 66. № 5. P. 711–720.

3. Heger P., Marin B., Bartkuhn M., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. V. 109. № 43. P. 17507–17512.

4. Федотова А.А., Бончук А.Н., Могила В.А., и др. // Acta Naturae. 2017. V. 9. P. 47–58.

5. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., et al. // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. № 4. P. 2375–2389.

6. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O., et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241.

7. Stogios P.J., Downs G.S., Jauhal J.J.S., et al. // Genome Biol. 2005. V. 6. № 10. P. 1–18.

8. Liang Y., Huimei Hong F., Ganesan P., et al. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 17. P. 8721–8732.

9. Al Chiblak M., Steinbeck F., Thiesen H.J., et al. // BMC Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 1. P. 1–23.

10. Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 2677.

11. Loukinov D.I., Pugacheva E., Vatolin S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. V. 99. № 10. P. 6806–6811.

12. Maksimenko O., Kyrchanova O., Klimenko N., et al. // Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech. 2020. V. 1863. № 1. P. 1863.

13. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al. // Open Biol. 2017. V. 7. № 10. P. 170150.

14. Li L., Williams P., Ren W., et al. // Nat. Chem. Biol. 2021. V. 17. № 2. P. 161–168.

STUDY OF THE N-TERMINAL DOMAINS HOMODIMERIZATION IN HUMAN PROTEINS WITH ZINC FINGER CLUSTERS

D. V. Fursenko^a, Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and A. N. Bonchuk^{a,*}

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

[#]*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru*

CTCF belongs to a large family of transcription factors with clusters of C2H2 type zinc finger domains (C2H2 proteins) and is a main architectural protein in mammals. Human CTCF has a homodimerizing unstructured domain at the N-terminus which is involved in long-distance interactions. To test the presence of similar N-terminal domains in other human C2H2 proteins, a yeast two-hybrid system was used. In total, the ability of unstructured N-terminal domains to homodimerize was investigated for six human C2H2 proteins with an expression profile similar to CTCF. The data indicate lack of the homodimerization ability of these domains. On the other hand, three C2H2 proteins containing the structured domain DUF3669 at the N-terminus demonstrated homo-, as well as heterodimerization activity.

Keywords: C2H2 proteins, dimerization, DUF3669, ZFP, transcription factor

УДК 57.58.581.2:632.4

ВЛИЯНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *Beauveria bassiana* НА РАЗВИТИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОРМОВЫХ БОБОВ (*Vicia faba*) В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

© 2021 г. Л. Ф. Ашмарина^{1,*}, Г. Р. Леднёв², О. Г. Томилова³, Т. А. Садохина¹, Д. Ю. Бакшаев¹, М. В. Левченко², Н. С. Волкова², М. В. Тюрин³, В. П. Данилов¹, член-корреспондент РАН В. В. Глухов³

Поступило 10.04.2021 г.

После доработки 20.04.2021 г.

Принято к публикации 23.04.2021 г.

Известно, что энтомопатогенные грибы способны выступать в качестве эндофитов. Показано, что гриб *Beauveria bassiana* (штамм ББК-1) успешно колонизировал растения кормовых бобов *Vicia faba* в лабораторных и полевых условиях. Реизолят *B. bassiana*, пропассированный через растения, обладал существенно более высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов в сравнении с исходным штаммом. Оценка влияния *B. bassiana* на развитие и распространенность комплекса болезней кормовых бобов в полевых условиях Западной Сибири показала, что предпосевная обработка семян энтомопатогеном уменьшала уровень зараженности семенного материала возбудителями, достоверно снижала развитие и распространенность корневых гнилей. Установлено снижение индекса развития болезней (шоколадная пятнистость, мучнистая роса, фузариоз и прочие пятнистости) в результате применения *B. bassiana*. Эффективность и пролонгированное действие *B. bassiana* на растения открывают новые возможности, как в создании биопрепаратов, так и в молекулярно-генетических исследованиях и селекции определенных пар растений и грибов по принципу наибольшего синергизма.

Ключевые слова: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Vicia faba* L., энтомопатогенные грибы, эндофиты, фитопатогены, антагонистическая активность

DOI: 10.31857/S268673892104003X

ВВЕДЕНИЕ

С конца 90-х годов XX века было показано, что микромицеты, известные как энтомопатогены (представители р. *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Lecanicillium*), способны выступать в качестве эндофитов [1, 2]. К настоящему времени имеется значительное количество сообщений об обнаружении грибов этой группы, как в культурных, так и в дикорастущих растениях [3]. Существует также большое число публикаций по успешной искусственной колонизации энтомопатогенными грибами различных двудольных и однодольных растений [1]. Показано, что присутствие в расте-

ниях эндофитных форм энтомопатогенных грибов оказывает негативное влияние на насекомых-фитофагов и фитопатогенов (бактерий и грибов) [4, 3], а в ряде случаев приводит к ростстимулирующему эффекту на растениях [2].

Кормовые бобы *Vicia faba* L. занимают третье место среди возделываемых зернобобовых культур [5]. Потери в производстве бобовых от болезней могут достигать 70–80% [6]. Известно более ста возбудителей болезней этих культур [7]. В условиях континентального климата Западной Сибири бобовые поражаются целым комплексом болезней: корневые гнили (виды р. *Fusarium*, *Alternaria*), пятнистости листьев (виды р. *Fusarium*, *Alternaria*), мучнистая роса (*Erysiphe communis* (Wallr.) Grev. f. *faba* Jacz.), шоколадная пятнистость (*Botrytis fabae* Sard.) [8]. В связи с этим необходимо проводить поиск и разработку экологически безопасных подходов при выращивании бобовых. Хорошо известно, что энтомопатогенные грибы р. *Beauveria* могут успешно колонизировать бобовые культуры [9]. Однако в основном результаты были получены только в лабораторных условиях. А в полевых, в том числе в условиях

¹ Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт систематики и экологии животных Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: alf8@yandex.ru

континентального климата России, имеются лишь единичные работы в этом направлении, но по другим культурам [10]. Следует отметить, что в полевых условиях растения обычно поражаются целым комплексом патогенов. В связи с этим целью наших исследований была оценка возможности колонизации кормовых бобов штаммом гриба *B. bassiana* и его антагонистическая активность к фитопатогенам в лабораторных условиях, а также его влияния на комплекс основных болезней в агроценозе данной культуры в Западной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являлся штамм гриба *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (ББК-1), изолированный из трупа итальянского пруса *Calliptamus italicus* L., собранного в Карасукском р-не Новосибирской обл. из коллекции ФБГНУ ВИЗР. Для оценки антагонистической активности был взят реизолят этого штамма (ББК-1(Re)), пропассированный через растения бобов. Видовая и внутривидовая идентификация *B. bassiana* проводилась по межгенному локусу В (Bloc). Для лабораторных опытов гриб выращивали в чашках Петри на агаризированной среде Сабуро. Конидиальную массу для полевого эксперимента нарабатывали методом двухфазного культивирования (первая фаза в глубинной культуре на среде Сабуро, вторая — поверхностно на лущеном зерне ячменя). Титр — 5×10^9 конидий/г.

В опытах использовали семена бобов (*V. faba*) сорт “Русский черный” (лаборатория) и “Сибирские” (полевые условия).

В лабораторных условиях растения выращивали на стерильной почвенно-песчаной смеси (соотношение 1:1). Инокуляцию проводили методом замачивания семян в суспензии конидий, пролива почвы (5 мл/растение) и опрыскивания вегетирующих растений (до полного его смачивания) по стандартным методикам [11]. Титр — 5×10^7 конидий/мл. Оценку эндофитной колонизации растений (в ходе лабораторного и полевого экспериментов) и выделение реизолятов (лабораторный опыт) проводили согласно [12]. Количественную оценку КОЕ в почве ризосферы (полевой опыт) проводили по методикам, описанным ранее [10].

Оценку антагонистической активности штамма ББК-1 *B. bassiana* и реизолята ББК-1(Re) проводили *in vitro* в отношении грибных фитопатогенов из р. *Fusarium oxysporum* (штамм 4.5), *F. solani* (4.9), *Rhizoctonia* sp. (6.2), *Bipolaris sorokiniana* (2.7) и *Botrytis cinerea* (3.4) (из рабочей коллекции ВИЗР) по методике совместного культивирования [13]. Ингибирующую активность (ИА) *B. bassiana* оценивали по изменению диаметра колоний

фитопатогена в присутствии *B. bassiana* в сравнении с контролем [14].

Полевые исследования проводили в 2020 г. на стационаре Сибирского института кормов СФНЦА РАН (Новосибирская область, 54°55'N, 82°56'E). Тип почвы — чернозем выщелоченный, среднемогучный, среднесуглинистый, содержание органического углерода в почве 3.48%, pH — 5.3. Семена кормовых бобов инокулировали суспензией конидий *B. bassiana* с титром 5×10^7 конидий/мл из расчета 2.5 л на 20 кг семян. На пятый день после обработки был проведен их микологический анализ по стандартным методикам. Визуальные учеты поражения растений различными заболеваниями проводили в поле на 28-й (корневые гнили) и 80-й (листочкостеблевые болезни) день после посева. Через 28 дней после посева отбирали растения для микологического анализа на пораженность возбудителями корневых гнилей.

Нормальность распределения данных проверяли с помощью W критерия Шапиро—Уилка. Нормально распределенные данные анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Ненормально распределенные данные были проанализированы с помощью теста Манна—Уитни. Для сравнения доли колонизации семян и растений грибами использовали точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В лабораторных условиях при всех трех способах инокуляции бобов грибом *B. bassiana* уровень колонизации был достаточно высок — 67, 78 и 78% соответственно. Статистически достоверных различий между вариантами не было ($p \geq 0.3$). Анализ уровня локализации гриба при разных способах колонизации показал значительные различия по данному показателю. При обработке семян гриб был зафиксирован в корнях и стеблях растений (58 и 42% соответственно). При проливе почвы он был локализован во всех проанализированных частях растений, хотя на листья приходилось лишь 8%. При обработке вегетирующих растений гриб был зафиксирован преимущественно в стеблях и листьях (56 и 40%). Для дальнейших полевых испытаний была выбрана инокуляция семян водной суспензией конидий как более технологичный и менее затратный способ.

Оценка антагонистической активности гриба *B. bassiana* (ББК-1) *in vitro* показала, что выбранный для полевого эксперимента штамм способен ингибировать рост ряда почвенных фитопатогенов (*F. oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans, *F. solani* (Mart) App. et Wr., *Rhizoctonia* spp., *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *B. cinerea* Pers.). ИА штамма ББК-1 составила 22.6—44.4% в зависимости от вида фитопатогена (рис. 1). Антагонистические

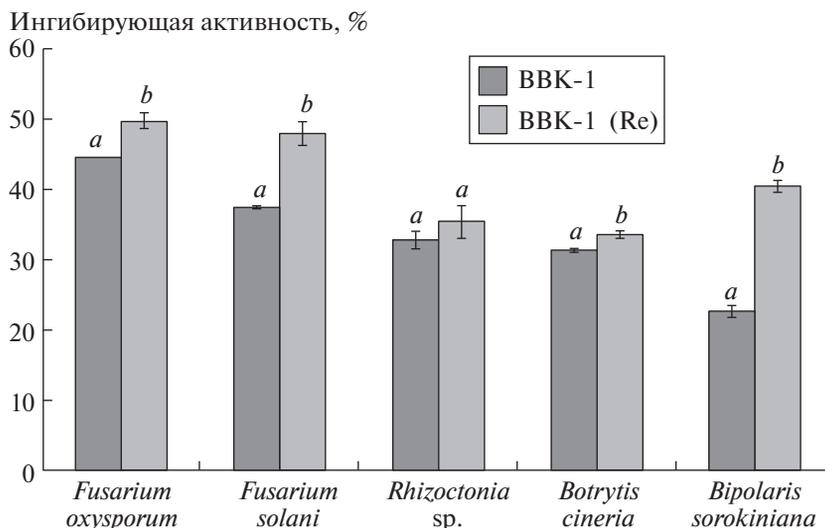


Рис. 1. Ингибирующая активность штаммов *B. bassiana* в отношении фитопатогенов (15-е сутки совместного роста). Разными буквами отмечено наличие достоверных различий в сравнении с исходным штаммом (t -тест, $p < 0.05$).

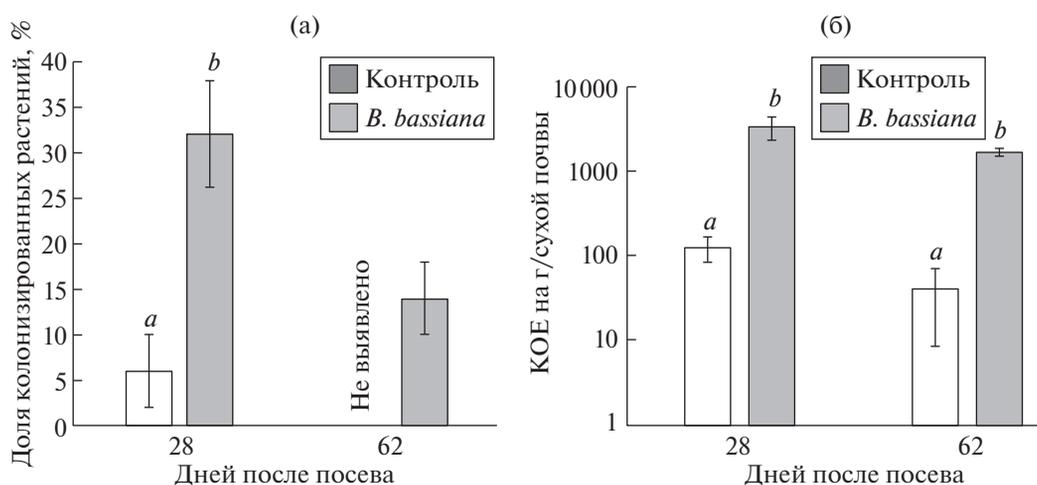


Рис. 2. Колонизация растений бобов и ризосферной почвы *B. bassiana*. Разными буквами отмечено наличие достоверных различий в сравнении с исходным штаммом (Манна–Уитни тест, $p < 0.05$).

свойства реизолята, полученного из растений бобов, были достоверно выше в отношении всех оцениваемых культур фитопатогенов (t -тест, $p \leq 0.01$), за исключением *Rhizoctonia sp.*

Анализ подземных частей растений в полевом эксперименте на присутствие в них *B. bassiana* показал относительно невысокий уровень эндофитной активности гриба. В фазу стеблевания (28 дней после посева) было колонизировано только 32% растений, а в период цветения (62 дня после посева) лишь 14% (рис 2а).

При этом в почве ризосферы гриб присутствовал в достаточно высокой плотности (в течение двух месяцев после инокуляции выше 1×10^4 КОЕ/г сухой почвы) (рис. 2б).

Инокулированные для данного эксперимента семена бобов *B. bassiana* изначально были довольно сильно инфицированы возбудителями корневых гнилей: *Alternaria* – 57.0%, *Fusarium* – 8.0%.

Анализ зараженности посевного материала показал, что обработка семян бобов конидиями *B. bassiana* угнетала развитие патогенов (табл. 1).

Биологическая эффективность обработки в отношении грибов р. *Alternaria* и *Fusarium* на семенах составила 64.9%. Существенный уровень достоверности получен в снижении зараженности семян только грибами р. *Alternaria* (точный тест Фишера, $p < 0.0001$).

Установлено, что обработка семян *B. bassiana* приводит к снижению развития корневых гнилей

Таблица 1. Влияние предпосевной обработки семян бобов конидиями *B. bassiana* на их зараженность фитопатогенами (среднее по повторности \pm ошибка ср.)

Вариант	Доля семян, заселенных грибными патогенами, %				
	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>
Контроль	60.71 \pm 5.35	8.14 \pm 3.76	5.43 \pm 3.18	1.43 \pm 1.43	16.29 \pm 5.74
<i>B. bassiana</i>	21.29 \pm 5.46*	2.86 \pm 1.91	2.43 \pm 1.65	4.29 \pm 4.29	9.71 \pm 5.70

* – наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (точный тест Фишера, $p < 0.0001$).

Таблица 2. Анализ подземных органов бобов на зараженность возбудителями корневых гнилей (среднее по повторности \pm ошибка ср.)

Вариант	Количество колоний в чашке Петри				
	<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	Прочие
Контроль	8.00 \pm 0.55	2.40 \pm 0.81	1.00 \pm 0.32	–	0.40 \pm 0.25
<i>B. bassiana</i>	6.80 \pm 0.66	0.60 \pm 0.25*	0.40 \pm 0.25	0.40 \pm 0.25	–

* – наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (точный тест Фишера, $p = 0.01$).

на ранних стадиях роста растений (4 нед. после посадки) (рис. 3).

У растений, инокулированных *B. bassiana*, индекс развития болезни (ИРБ) был в 2.37 раза ниже в сравнении с контролем (тест Манна–Уитни, $p = 0.01$). Статистически значимые различия наблюдались также и при оценке распространенности корневых гнилей на подземных органах бобов ($p = 0.01$). Биологическая эффективность обработки семян *B. bassiana* в снижении развития инфекции составила 57.78%.

Из подземных органов растений бобов были изолированы преимущественно грибы р. *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* (табл. 2), что подтверждает их участие в этиологии заболеваний бобов.

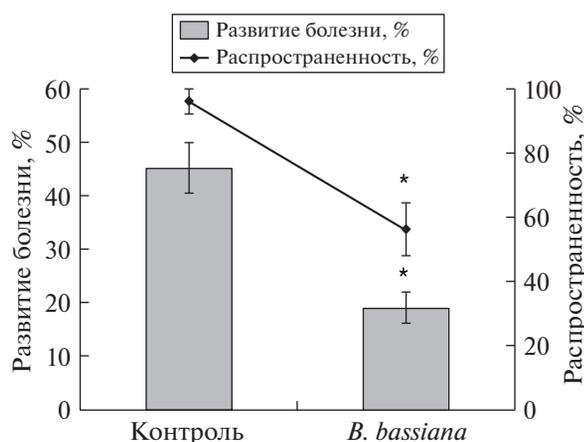


Рис. 3. Развитие и распространенность корневых гнилей подземных органов бобов (среднее по повторности \pm ошибка ср.). * – наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (Манна–Уитни тест, $p < 0.05$).

Обработка семян *B. bassiana* оказывала существенное влияние только на инфицирование видами р. *Alternaria*, вызывая 4-кратное снижение зараженности (точный тест Фишера, $p = 0.01$). Также отмечено незначительное снижение численности грибов р. *Cladosporium* и *Fusarium* (2.5 и 1.18 раза соответственно). Таким образом, несмотря на изначальную зараженность семян и инфицирование корневой системы почвенными фитопатогенами, обработка семенного материала *B. bassiana* оказала значительный защитный эффект.

Выявлено существенное влияние *B. bassiana* на проявление различных листовых болезней, максимальное развитие которых зафиксировано в фазу молочной спелости (рис. 4).

ИРБ мучнистой росы в контроле в 2.1 раза выше, чем в опытном варианте (Манна–Уитни тест, $p = 0.0001$). Для шоколадной пятнистости при использовании *B. bassiana* также отмечено статистически значимое снижение развития болезни (в 2.2 раза) ($p = 0.0005$). Наблюдения за развитием фузариоза показали, что снижение ИРБ составило 2.3 раза, хотя и не являлось статистически значимым ($p = 0.28$). Статистически значимые различия между контролем и вариантом с обработкой *B. bassiana* выявлены по развитию листовых пятнистостей, вызываемых комплексом грибов из рода *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium* ($p < 0.0001$).

В результате проведенных исследований в континентальных условиях Западной Сибири мы впервые установили, что обработка семян кормовых бобов *V. faba* грибом *B. bassiana*, выращенных в полевых условиях, повышает устойчивость растений к комплексу заболеваний. Растения, после обработки *B. bassiana*, в меньшей степени пора-

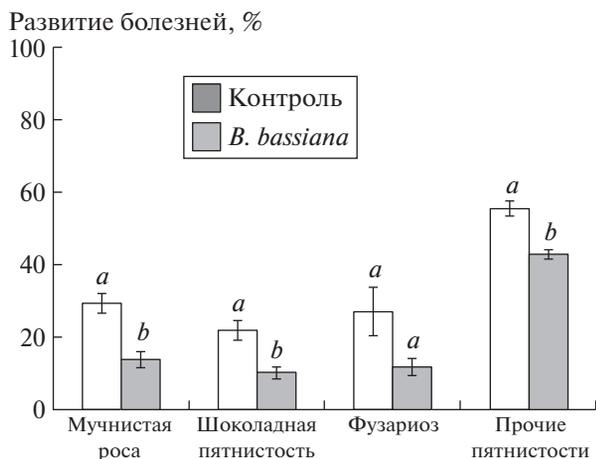


Рис. 4. Интенсивность развития листовых болезней бобов в фазу молочной спелости бобов (среднее значение по растению). Разными буквами отмечено наличие достоверных различий в сравнении с контрольным вариантом (Манна–Уитни тест, $p < 0.05$).

жались корневыми гнилями, мучнистой росой, шоколадной и другими пятнистостями. Этот эффект мы наблюдали в течение всего периода вегетации бобов.

Аналогичные исследования были проведены на различных видах других растений, но в основном в лабораторных условиях, где не регистрировался комплекс заболеваний [15]. Следует также отметить, что эндофитные взаимоотношения между грибом *B. bassiana* и растениями, в данном случае с бобами, могут носить факультативно-мутуалистический характер. С одной стороны, снижается повреждаемость растений насекомыми и фитопатогенами [16], с другой, энтомопатогенные грибы получают дополнительный источник питательных веществ и, за счет локализации в прикорневой зоне (ризосфере) или в тканях растений, могут длительно персистировать в ценозах [17].

Стоит отметить, что энтомопатогенные грибы могут подавлять развитие фитопатогенов в растениях-хозяевах в результате конкуренции и микопаразитизма (своеобразный антибиоз) [4], за счет синтеза первичных и вторичных метаболитов, ферментов [14]. Хорошо известно, что ряд вторичных метаболитов *B. bassiana*, в частности ооспорейн и боверицин, обладают ярко выраженной фунгицидной активностью [18, 19].

Ранее было показано, что данный гриб экспрессирует антимикробный пептид (VbAFP1), локализирующийся в клеточной стенке конидий, затем пептид высвобождается наружу и подавляет рост конкурирующих грибов, в частности *Alternaria brassicae* [20]. Второй механизм подавления фитопатогенов может быть основан на индуцировании системной резистентности с одновременной стимуляцией роста растений [4, 21]. Можно

предположить, что обработка растений, в данном случае семян, энтомопатогенным грибом запускает несколько физиологических механизмов, приводящих к повышенной устойчивости против комплекса патогенов в течение всего периода вегетации. Эффективность и пролонгированное действие *B. bassiana* на растения открывают новые возможности, как в создании биопрепаратов, так и в молекулярно-генетических исследованиях и селекции определенных пар растений и грибов по принципу наибольшего синергизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vega F.E. Insect pathology and fungal endophytes // J. Invertebr. Pathol. 2008. V. 98. № 3. P. 277–279.
2. Hu S., Bidochka M.J. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi // J. Appl. Microbiol. 2021. V. 130. № 2. P. 570–581.
3. Vega F.E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review // Mycologia. 2018. V. 110. № 1, P. 4–30.
4. Ownley B., Gwinn K., Vega F. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution // BioControl. 2010. V. 55. P. 113–128.
5. Sing A.K., Bharati R., Pedapati A. An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect // African J. of Agricultural Research. 2013. V. 8. № 50. P. 6634–6641.
6. Horoszkiewicz-Janka J., Jajor E., Korbas M. Potential risk of infection of pathogenic fungi to legumes (Fabales) and possibilities of their control // Prog. Plant Protect. 2013. V. 53. P. 762–767.
7. Hebblethwaite P.D. The Faba Bean // Butterworths, London, U.K., 1983.
8. Ашмарина Л.Ф., Горобей И.М., Коняева Н.М., и др. Атлас болезней кормовых культур в Западной Сибири. Новосибирск, 2010.
9. Akutse K.S., Maniania N.K., Fiaboe K.K., et al. Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life – history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) // Fungal Ecology. 2013. V. 6. P. 293–301.
10. Tomilova O.G., Shaldyaeva E.M., Kryukova N.A., et al. Entomopathogenic fungi decrease *Rhizoctonia* disease in potato in field conditions // Peer J. 2020. V. 8. P. e9895.
11. Gurulingappa P., Sword G.A., Murdoch G., et al. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta // Biol. Control. 2010. V. 55. P. 34–41.
12. Parsa S., Ortiz V., Vega F.E. Establishment of fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control // J. Vis. Exp. 2013. V. 11. № 74. P. 50360.
13. Sobowale A.A., Odebode A.C., Cardwell K.F., et al. Antagonistic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and *T. hamatum* resident on maize (*Zea mays*) plant against *Fusarium verticillioides* (Nirenberg) isolated from rot-

- ting maize stem // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2010. V. 43. P. 744–753.
14. Barra-Bucarei L., Iglesias A.F., González M.G., et al. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two solanaceae crops // Microorganisms. 2020. V. 8. № 1. P. 65.
 15. Jensen R.E., Enkegaard A., Steenberg T. Increased fecundity of *Aphis fabae* on *Vicia faba* plants following seed or leaf inoculation with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* // PLoS One. 2019. V. 14. № 10. P. e0223616.
 16. White J.F., Belanger F., Meyer W., et al. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes-development of symbiotic interactions with plants // Symbiosis. 2002. V. 33. № 3. P. 201–213.
 17. Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere // FEMS Microbiol Ecol. 2009. V. 68. № 1. P. 1–13.
 18. Wang Q., Xu L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review // Molecules. 2012. V. 17. № 3. P. 2367–2377.
 19. Nagaoka T., Nakata K., Kouno K., et al. Antifungal Activity of Oosporein from an Antagonistic Fungus against *Phytophthora infestans* // Zeitschrift fur Naturforschung. 2004. V. 59. № 3–4. P. 302–304.
 20. Tong S., Li M., Keyhani N.O., Liu Y., et al. Characterization of a fungal competition factor: production of a conidial cell-wall associated antifungal peptide // PLOS Pathogens. 2020. V. 16. № 4. P. e1008518.
 21. Raad M., Glare T.R., Brochero H.L., et al. Transcriptional reprogramming of *Arabidopsis thaliana* defence pathways by the entomopathogen *Beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects hormones, plant–microbe interaction, *Plutella xylostella*, *Myzus persicae*, *Sclerotinia sclerotiorum* // Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. P. 615.

EFFECT OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana* ON THE DEVELOPMENT OF FABA BEAN (*Vicia faba*) DISEASES IN THE FIELD CONDITIONS

**L. F. Ashmarina^{a, #}, G. R. Lednev^b, O. G. Tomilova^c, T. A. Sadokhina^a, D. Yu. Bakshaev^a,
M. V. Levchenko^b, N. S. Volkova^b, M. V. Tyurin^c, V. P. Danilov^a,
and Corresponding Member of the RAS V. V. Glupov^c**

^a Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies (SFSCA) of the RAS, Novosibirsk, Russian Federation

^b All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russian Federation

^c Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation

[#]e-mail: alf8@yandex.ru

Several ascomycetous entomopathogenic fungi, including species in the genera *Beauveria*, are plant symbionts/endophytes and are termed as endophytic insect-pathogenic fungi. It was shown that the fungus *Beauveria bassiana* (BBK-1 strain) successfully colonized *Vicia faba* bean plants in laboratory and field conditions of Western Siberia. The *B. bassiana* reisolat passed through the plants had significantly higher antagonistic activity against phytopathogens in comparison with the primary stem of entomopathogenic fungi. Pre-sowing faba bean seeds treatment reduced the level of infection of the seed material with phytopathogens, significantly decrease the development and prevalence of root rot disease. A decrease in the disease development index (chocolate spot, powdery mildew, fusariosis and other spots diseases) was found as a result of the use of *B. bassiana*. The effectiveness and prolonged action of *B. bassiana* on plants opens up new opportunities, both in the creation of biological products, and in molecular-genetic research and selection of certain pairs of plants and fungi on the principle of the greatest synergy.

Keywords: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Vicia faba* L., entomopathogenic fungi, endophytes, phytopathogens, antagonistic activity