

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 500, 2021

- Крупный дикобраз *Hystrix refossa* (Rodentia, Hystriidae) из раннеплейстоценового местонахождения Таврида в Крыму  
*А. В. Лопатин* 391
- Плейстоценовые лисицы (*Vulpes*, Canidae, Carnivora) из пещеры Таврида, Крым  
*Д. О. Гимранов, С. Бартолини-Лученти, А. В. Лавров, Б. А. Вахрушев, А. В. Лопатин* 402
- Древнейшие эукариоты лахандинской биоты (мезопротерозой, Юго-Восточная Сибирь) – морфологические и биогеохимические данные  
*Ю. В. Шувалова, К. Е. Наговицин, Я.-П. Дуда, П. Ю. Пархаев* 407
- Внутрикорковые направленные связи при удержании информации в зрительно-пространственной рабочей памяти  
*Е. С. Михайлова, А. В. Курганский, Р. А. Нуштаева, Н. Ю. Герасименко, А. Б. Кушнин* 414
- Теоретические репродуктивные следствия конфликта полов у человека  
*О. В. Семенова, М. Л. Бутовская* 420
- Реконструкция паттернов электрических разрядов и механизмы электрогенерации у африканского клариевого сома *Clarias gariepinus* (Clariidae, Siluriformes)  
*А. А. Орлов, В. М. Ольшанский, В. Д. Барон* 428
- Особенности питания глубоководного кишечнодышащего (Hemichordata, Enteropneusta, Torquaratoridae) из Берингова моря  
*О. В. Ежова, М. А. Трухан, А. И. Лукиных, Е. М. Крылова, С. В. Галкин, А. В. Гебрук, В. В. Малахов* 432
- Особенности цикла сон–бодрствование и циркадной активности малого оленька (*Tragulus kanchil*)  
*О. И. Лямин, Д. М. Сигал, Р. В. Евсигнеев, Е. А. Назаренко, В. В. Рожнов* 437
- Определение сродства эукариотической РНК-хеликазы DDX3 к характерным элементам вторичной структуры мРНК  
*А. Б. Шикалов, О. В. Сергеева, Т. С. Зацепин* 443
- Низкоинтенсивная лазерная терапия как метод снижения стрессовых реакций после септопластики  
*И. В. Кастыро, В. И. Попадюк, Г. М. Мурадов, И. В. Решетов* 446
- Sfmbt взаимодействует с белком Hangover и субъединицами SWI/SNF-комплекса у *Drosophila melanogaster*  
*М. М. Ерохин, Ю. В. Шидловский, Д. В. Ломаев, П. Г. Георгиев, Д. А. Четверина* 451

Ингибирование онкогена <i>c-MYC</i> антибиотиками-производными ауреоловой кислоты	455
<i>А. К. Исагулиева, Н. В. Сошникова, А. А. Штиль</i>	
Онтогенетическая, световая и циркадная регуляция экспрессии генов РАР белков при прорастании семян <i>Arabidopsis thaliana</i>	460
<i>А. А. Андреева, Н. В. Кудрякова, Вл. В. Кузнецов, В. В. Кузнецов</i>	
Влияние биомеханической совместимости и тромбогенности нового синтетического сосудистого протеза на его интеграцию в артериальное русло (экспериментальное исследование)	466
<i>Ю. М. Цыганков, А. А. Сергеев, Ш. Т. Жоржколиани, А. Д. Шепелев, С. В. Крашенинников, Т. Х. Тенчурин, А. В. Агафонов, А. Ю. Городков, Л. А. Бокерия</i>	
Роль ионов калия в регуляции кальций-активируемых хлорных каналов	470
<i>В. Л. Замойский, Е. В. Бовина, С. О. Бачурин, В. В. Григорьев</i>	
Индукция оксидом азота пролин-иминопептидазы может быть причиной накопления пролина в корнях гороха	474
<i>А. М. Егорова, И. А. Тарчевский</i>	
Аминокислотный спектр плазмы крови эндемичного и инвазивного видов земноводных фауны Урала	478
<i>Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная, В. А. Мищенко, Д. Л. Берзин, В. Н. Большаков</i>	
Сканирующая оптически-зондовая нанотомография для исследования структуры биоматериалов и клеток	483
<i>О. И. Агапова, А. Е. Ефимов, Л. А. Сафонова, М. М. Боброва, И. И. Агапов, С. В. Готье</i>	
Использование антигенного белка ВПЧ6 L1 для индукции синтеза интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов, а также гранзима В в крови и спленоцитах мышей для разработки вакцины против аногенитальных папилломатозов	488
<i>Р. К. Саляев, Н. И. Рекославская</i>	

---

---

# CONTENTS

---

---

Vol. 500, 2021

---

---

The Large Porcupine <i>Hystrix refossa</i> (Rodentia, Hystricidae) from the Early Pleistocene Taurida Locality in Crimea <i>A. V. Lopatin</i>	391
Pleistocene Foxes ( <i>Vulpes</i> , Canidae, Carnivora) from the Taurida Cave, Crimea <i>D. O. Gimranov, S. Bartolini Lucenti, A. V. Lavrov, B. A. Vakhrushev, and A. V. Lopatin</i>	402
Early Eukaryotes in the Lakhanda Biota (Mesoproterozoic, Southeastern Siberia) – Morphological and Geochemical Evidence <i>J. V. Shuvalova, K. E. Nagovitsin, J.-P. Duda, and P. Yu. Parkhaev</i>	407
Intracortical Directional Connections for Holding Information in Visual-spatial Working Memory <i>E. S. Mikhailova, A. V. Kurgansky, R. A. Nushtaeva, N. Yu. Gerasimenko, and A. B. Kushnir</i>	414
Theoretical Reproductive Outcomes of the Sexual Conflict Over Parental Care in Humans <i>O. V. Semenova, M. L. Butovskaya</i>	420
Reconstruction of Electric Discharge Patterns and Electrogenesis Mechanisms in African Sharptooth Catfish <i>Clarias gariepinus</i> (Clariidae, Siluriformes) <i>A. A. Orlov, V. M. Olshanskiy, and V. D. Baron</i>	428
Feeding Peculiarities of Deep-sea Acorn Worm (Hemichordata, Enteropneusta, Torquaratoridae) from the Bering sea <i>O. V. Ezhova, M. A. Trukhan, A. I. Lukinykh, E. M. Krylova, S. V. Galkin, A. V. Gebruk, and V. V. Malakhov</i>	432
Characteristics of Sleep-wakefulness Cycle and Circadian Activity in the Lesser MOUSE-Deer ( <i>Tragulus kanchil</i> ) <i>O. I. Lyamin, J. M. Siegel, R. V. Evsigeev, E. A. Nazarenko, and V. V. Rozhnov</i>	437
Determination of the Affinity of Eukaryotic DDX3 RNA Helicase to the Characteristic Elements of mRNA Secondary Structure <i>A. B. Shikalov, O. V. Sergeeva, and T. S. Zatsepin</i>	443
Low-intensity Laser Therapy as a Method to Reduce Stress Responses after Septoplasty <i>I. V. Kastyro, V. I. Popadyuk, G. M. Muradov, and I. V. Reshetov</i>	446
Sfmbt Co-purifies with Hangover and SWI/SNF-remodelers in <i>Drosophila melanogaster</i> <i>M. M. Erokhin, Y. V. Shidlovskii, D. V. Lomaev, P. G. Georgiev, and D. A. Chetverina</i>	451
Inhibition of the <i>c-MYC</i> Oncogene by the Aureolic Acid Group Antibiotics <i>A. K. Isagulieva, N. V. Soshnikova, and A. A. Shtil</i>	455

Ontogenetic, Light and Circadian Regulation of <i>PAP</i> Protein Genes During Seed Germination of <i>Arabidopsis thaliana</i>	460
<i>A. A. Andreeva, N. V. Kudryakova, Vl. V. Kuznetsov, and V. V. Kusnetsov</i>	
The Effect of Mechanical Compatibility and of Thrombogenicity on the Ingrowth of a New Synthetic Vascular Prosthesis (Experimental study)	466
<i>Y. M. Tsygankov, A. A. Sergeev, Sh. T. Zhorzholiani, A. D. Shepelev, S. V. Krasheninnikov, T. Kh. Tenchurin, A. V. Agafonov, A. Yu. Gorodkov, and L. A. Bockeria</i>	
Role of Potassium Ions in Regulation of Calcium-activated Chloride Channels	470
<i>V. L. Zamoyski, E. V. Bovina, S. O. Bachurin, and V. V. Grigoriev</i>	
Induction of Proline Iminopeptidase by Nitric Oxide May Result in the Proline Accumulation in the Pea Roots	474
<i>A. M. Egorova and I. A. Tarchevsky</i>	
Amino Acid Spectrum in the Blood of the Endemic and Invasive Amphibian Species in the Fauna of the Ural	478
<i>L. A. Kovalchuk, L. V. Chernaya, V. A. Mishchenko, D. L. Berzin, and V. N. Bolshakov</i>	
Scanning Optical Probe Nanotomography for Investigation of the Structure of Biomaterials and Cells	483
<i>O. I. Agapova, A. E. Efimov, L. A. Safonova, M. M. Bobrova, I. I. Agapov, and S. V. Gautier</i>	
The Use of the Antigenic Protein HPV6 L1 to Induce the Synthesis of Interferon, CD4 and CD8 T Lymphocytes and Granzyme B in Blood and Splenocytes of Mice in Order TO Develop a Broad Vaccine Against Anogenital Papillomatoses	488
<i>R. K. Salyaev and N. I. Rekoslavskaya</i>	

УДК 569.324.3:551.793(477.75)

## КРУПНЫЙ ДИКОБРАЗ *HYSTRIX REFOSSA* (RODENTIA, HYSTRICIDAE) ИЗ РАННЕПЛЕЙСТОЦЕНОВОГО МЕСТОНАХОЖДЕНИЯ ТАВРИДА В КРЫМУ

© 2021 г. Академик РАН А. В. Лопатин<sup>1,\*</sup>

Поступило 27.04.2021 г.

После доработки 31.05.2021 г.

Принято к публикации 31.05.2021 г.

Остатки крупных дикобразов (неполный череп, черепные и нижнечелюстные фрагменты, изолированные зубы и кости посткраниального скелета) из раннеплейстоценового пещерного местонахождения Таврида в центральном Крыму (Белогорский район, пос. Зуя) отнесены к виду *Hystrix (Hystrix) refossa* Gervais, 1852, ранее из Крыма не известному. На основании стадий прорезывания, смены и стирания нижних зубов установлено присутствие в выборке особей шести возрастных групп – от ювенильной до сенильной. Одна нижнечелюстная кость демонстрирует прижизненную утрату щечных зубов, предположительно связанную с аномальным недоразвитием их корней и альвеол.

**Ключевые слова:** *Hystrix refossa*, Hystricidae, Rodentia, дикобразы, ранний плейстоцен, Крым, пещера Таврида, возрастные группы, зубные аномалии

**DOI:** 10.31857/S2686738921050206

В 2019 г. мной были описаны остатки мелкого дикобраза *Hystrix (Acanthion) vinogradovi* Argurov, 1941, обнаруженные годом ранее в раннеплейстоценовом пещерном местонахождении Таврида в центральном Крыму (Белогорский район, пос. Зуя) [1]. Сборы 2020 г. в южном коридоре пещеры Таврида дополнили коллекцию ископаемых позвоночных новыми материалами по *H. (A.) vinogradovi* и многочисленными находками остатков еще одного вымершего вида дикобразов – крупного *Hystrix (Hystrix) refossa* Gervais, 1852. Этот вид, широко распространенный в плейстоцене Евразии [2–4], в Крыму ранее известен не был. Указание [4, табл. 1] на находку зубов *H. refossa* в нижнем плейстоцене м. Тарханкут (оригинальное определение [5] – *Hystrix* sp.) ошибочно – судя по мелким размерам [5], эти остатки принадлежат *H. (A.) vinogradovi* [1].

Описанный ниже материал по *H. refossa* из пещеры Таврида хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве. Терминология зубных структур по [1], обозначения стадий стирания зубов по [6, 7]. Размеры в мм. Обозначения: AL – альвеолярная длина, AW – альвеолярная ширина, DL – длина диастемы, L – наибольшая длина, LD – продольный

диаметр, OL – окклюзиальная длина, OW – окклюзиальная ширина, TD – поперечный диаметр, W – наибольшая ширина; *n* – число экземпляров,  $\mu$  – среднее значение; dex – правый, sin – левый.

Отряд Rodentia Bowdich, 1821

Семейство Hystricidae Fischer von Waldheim, 1817

Подсемейство Hystricinae Fischer von Waldheim, 1817

Род *Hystrix* Linnaeus, 1758

Подрод *Hystrix* Linnaeus, 1758

*Hystrix (Hystrix) refossa* Gervais, 1852

*Hystrix refossa*: [8, с. 8, табл. 48, фиг. 11].

Г о л о т и п – Лаборатория палеонтологии Национального музея естественной истории, Париж; фрагмент правой нижнечелюстной кости с  $P_4$  и альвеолами  $M_1$  [2, табл. I, фиг. 1a, 1b]; Франция, Перье, Этуэр (Les Etouaires); верхний плиоцен, MN16b.

О п и с а н и е (рис. 1–4). Дикобраз крупных размеров с гипсодонтными зубами. Череп с умеренно высокой выпуклой крышей лобной области, с относительно высоким и широким затылком (экз. ПИН, № 5644/555; рис. 1, табл. 1). Носовые кости умеренно длинные, достигают уровня переднего корня скуловых дуг (сохранилась область носо-лобных швов). Передний корень скуловой дуги расположен антеролатеральнее  $P^4$ . Лобные кости длинные, лобно-теменные

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

\*e-mail: alop@paleo.ru

**Таблица 1.** Размеры (в мм) черепа *Hystrix refossa* Gervais, 1852 из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым (dex – правый; sin – левый)

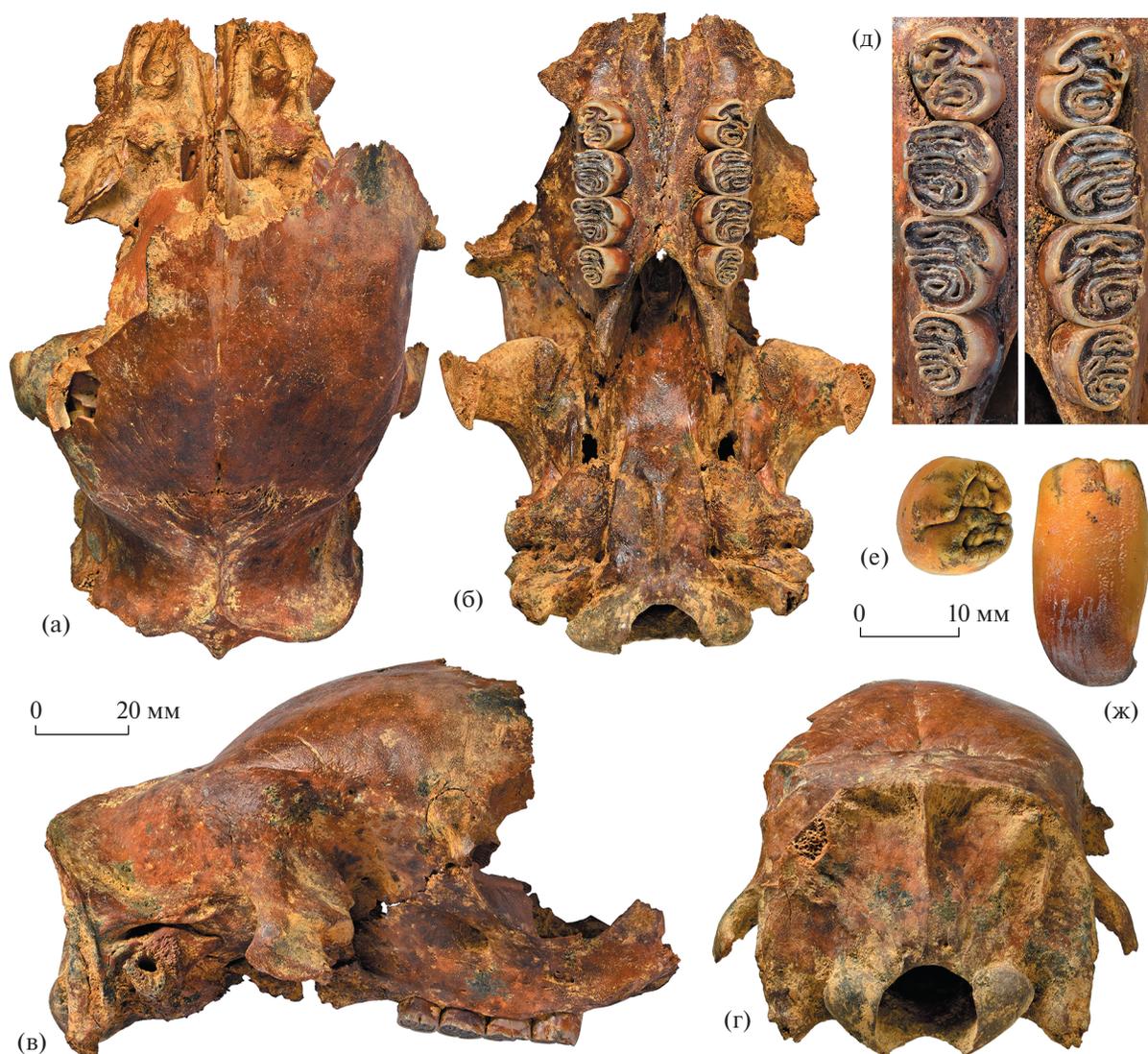
Параметр	Экземпляр ПИН, №		
	5644/555	5644/500	5644/550
Длина лобных костей	55.9	–	–
Длина теменных костей (от лобно-теменного шва до заднего края затылочного гребня)	36.0	30.5	42.4
Длина сагиттального гребня	20.8	21.0	23.7
Расстояние от заднего края твердого неба до затылочных мышелков	78.0	–	–
Расстояние от переднего края P <sup>4</sup> до заднего края твердого неба	31.0	–	–
Альвеолярная длина P <sup>4</sup> –M <sup>3</sup>	38.7 (dex); 39.0 (sin)	–	–
Окклюзиальная длина P <sup>4</sup> –M <sup>3</sup>	37.7 (dex); 37.8 (sin)	–	–
Расстояние между зубными рядами на уровне P <sup>4</sup>	13.6	–	–
Расстояние между зубными рядами на уровне M <sup>3</sup>	13.1	–	–
Высота черепа над M <sup>3</sup>	79.1	–	–
Высота затылка по средней линии	52.6	51.9	55.7
Наибольшая ширина затылка выше foramen magnum	61.5	64.0	68.9
Расстояние между отверстиями наружных слуховых проходов	64.3	64.5	71.0
Наибольшая ширина затылочных мышелков (между наружными краями)	38.3	–	41.7
Наибольшая ширина foramen magnum	18.0	–	19.5

швы находятся намного каудальнее заднего корня скуловых дуг. Теменная область широкая. Сагиттальный гребень высокий, тонкий, сравнительно короткий. Имеется короткая и широкая треугольная площадка позади лобных костей, образованная мощными теменными гребнями, ко-со расходящимися от переднего конца сагиттального гребня. Затылочный гребень резкий. Затылочные мышелки широкие и низкие, длинная ось их сочленовой поверхности субвертикальная. Заднее отверстие подглазничного канала находится на уровне передней части M<sup>2</sup>. На небной части верхнечелюстных костей перед P<sup>4</sup> имеются большие округлые впадины для *m. buccinator* [см. 9]. Передний край небо-верхнечелюстного шва расположен на уровне средней части M<sup>2</sup>. Задний край твердого неба находится на уровне передней части M<sup>3</sup>.

Верхние щечные зубные ряды параллельны друг другу (рис. 16), по длине P<sup>4</sup> = M<sup>2</sup> > M<sup>1</sup> > M<sup>3</sup>. P<sup>4</sup> в нестертом (экз. ПИН, № 5644/502) и слабо стертом (экз. ПИН, № 5644/555) состоянии имеют замкнутые парафлексии и постфлексии и широко открытые переднюю мезофлексию и гипофлексию. Антерофлексия (складка, выходящая на переднюю сторону) и задняя мезофлексия открыты на нестертом зубе. Передняя мезофлексия

лингвальным краем касается эмалевой стенки гипофлексии либо объединяется с этой складкой. Постфоссетта и задняя мезофоссетта соединены с лингвальной мезофоссеттой и образуют вместе с ней единую фоссетту подковообразной формы. На нестертом P<sup>4</sup> лингвальная эмалевая высота коронки превосходит длину жевательной поверхности в 2.3 раза, а высота гипострии составляет менее 20% от лингвальной эмалевой высоты коронки.

На значительно стертых M<sup>1</sup> (стадия стирания D) либо все складки замкнутые, либо остаются открытыми гипофлексия и передняя мезофлексия при очень коротких бороздках на соответствующих боковых сторонах (экз. ПИН, № 5644/555). Постфоссетта обособлена от более передней по положению загнутой назад фоссетты, объединяющей заднюю мезофоссетту и лингвальную мезофоссетту. На M<sup>2</sup> сходного строения гипофлексия открытая, передняя мезофлексия имеет узкий выход или замкнутая, эмалевые стенки задней мезофлексии сомкнуты у выхода, но при этом сохраняется четкая лабиальная бороздка (задняя мезострия). Парафоссетта слегка изогнута вперед и сужена в средней части. Для M<sup>3</sup> характерно наличие замкнутых гипофоссетты, парафоссетты и постфоссетты при открытых передней мезофлексии и задней мезофлексии. Парафоссетта сужена в



**Рис. 1.** *Hystrix refoffa* Gervais, 1852: а–д – экз. ПИН, № 5644/555, неполный череп: а – с дорсальной стороны, б – с вентральной стороны, в – с правой латеральной стороны, г – с затылочной стороны, д – верхние щечные зубные ряды; е, ж – экз. ПИН, № 5644/502, изолированный нестертый левый Р<sup>4</sup>: е – с окклюзиальной стороны, ж – с лингвальной стороны; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

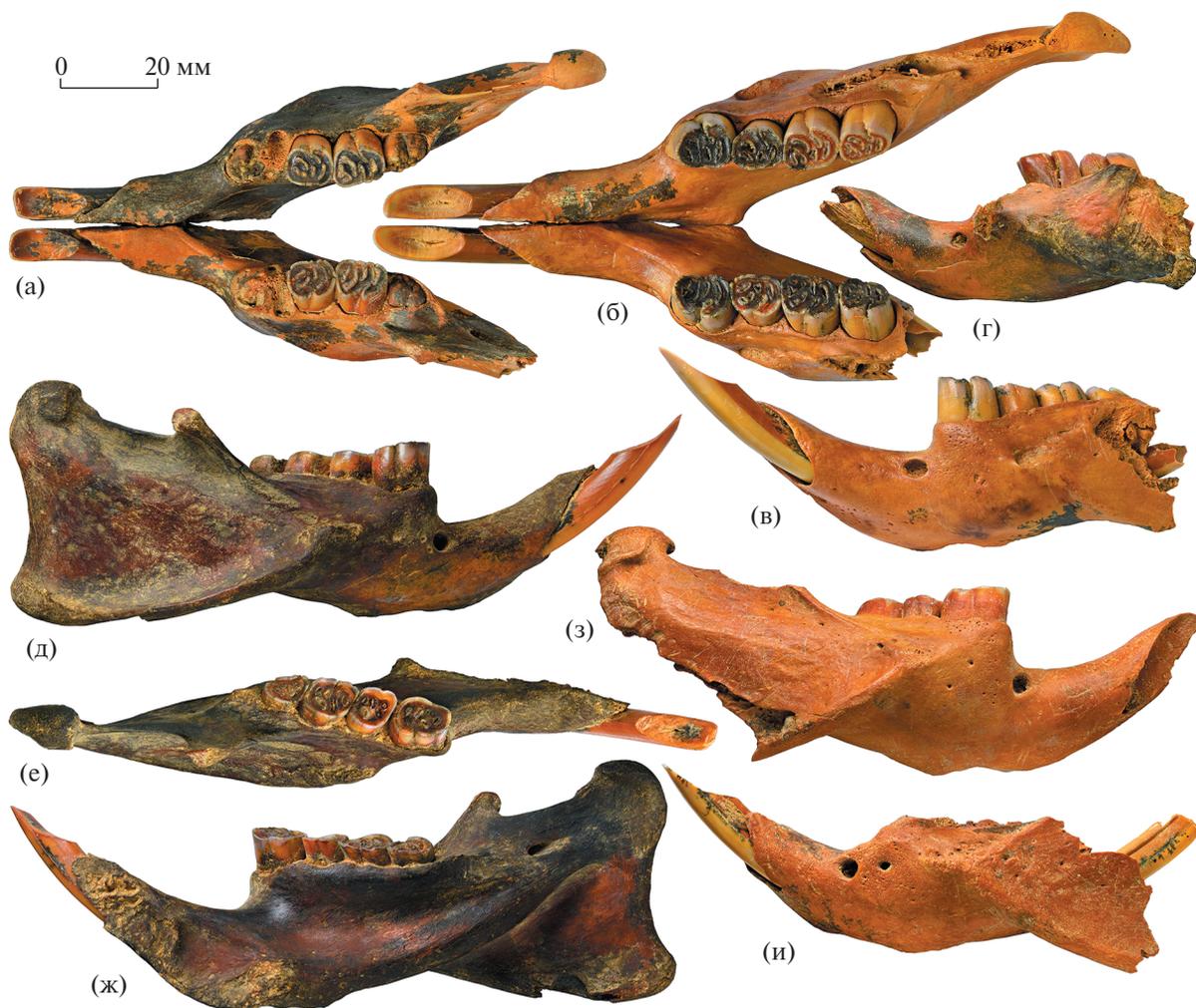
средней части. Задняя мезофлексия соединена с лингвальной мезофоссеттой, которая дистально объединена с постфоссеттой.

Нижнечелюстная кость массивная, но относительно низкая (рис. 2). Диастема по длине от 64–75% (у молодых особей) до 81–92% длины ряда щечных зубов (табл. 2). Сочленовный отросток немного выше венечного отростка. Венечный отросток с сильно утолщенной вершиной. Крупное подбородочное отверстие расположено у окончания диастемы, близко к дорсальному краю кости. Нижний массетерный гребень высокий, спереди оканчивается под М<sub>1</sub>, у некоторых сенильных особей с сильно стертymi щечными зубами достигает середины Р<sub>4</sub> (экз. ПИН, №№ 5644/521,

522). Симфиз простирается назад до уровня задней части нижнего премоляра (DP<sub>4</sub>/P<sub>4</sub>). Альвеолярный бугор нижнего резца умеренно вздутый.

DP<sub>4</sub> сравнительно небольшой, с узкой передней частью. Р<sub>4</sub> крупный, массивный, удлинённый. М<sub>1</sub> крупный, но в стертом состоянии уступает по окклюзиальной длине и ширине другим нижним щечным зубам. М<sub>2</sub> крупнее прочих моляров. М<sub>3</sub> относительно узкий в задней части.

У наиболее молодой особи (экз. ПИН, № 5644/524) жевательная поверхность недавно прорезавшегося М<sub>2</sub> ниже таковой М<sub>1</sub> (рис. 2г). М<sub>1</sub> слабо стертый, М<sub>2</sub> в состоянии начального стирания (стадия А/В1). На молярах с лингвальной стороны от-



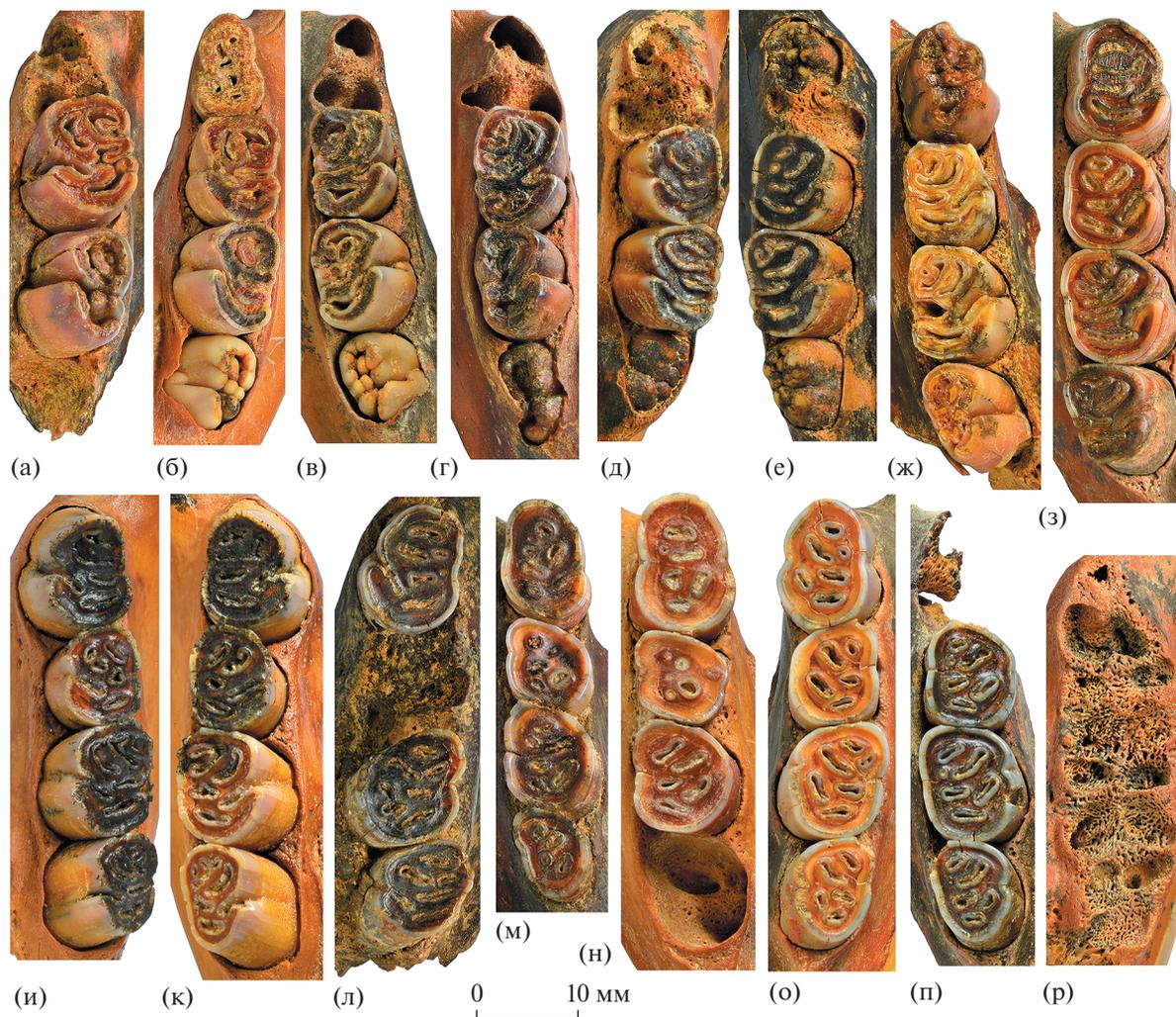
**Рис. 2.** *Hystrix refossa* Gervais, 1852: а – экз. ПИН, № 5644/503, парные нижнечелюстные кости с  $I_1$  и  $P_4-M_3$  с окклюзиальной стороны; б, в – экз. ПИН, № 5644/504, парные нижнечелюстные кости с  $I_1$  и  $P_4-M_3$ : б – с окклюзиальной стороны, в – левая нижнечелюстная кость с лабиальной стороны; г – экз. ПИН, № 5644/524, левая нижнечелюстная кость с  $I_1$  и  $M_1-M_2$  с лабиальной стороны; д–ж – экз. ПИН, № 5644/525, правая нижнечелюстная кость с  $I_1$  и  $P_4-M_3$ : д – с лабиальной стороны, е – с окклюзиальной стороны, ж – с лингвальной стороны; з – экз. ПИН, № 5644/509, правая нижнечелюстная кость с  $P_4-M_2$  с лабиальной стороны; и – экз. ПИН, № 5644/531, левая нижнечелюстная кость с  $I_1$  с лабиальной стороны; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

крыты три складки – передний мезофлексид, задний мезофлексид и постерофлексид (рис. 3а).

На стадии В1/В2 (экз. ПИН, №№ 5644/526, 527, 534, 536)  $DP_4$  сильно стертый,  $M_1$  и  $M_2$  слабо стертые,  $M_3$  в состоянии прорезывания, едва выступает над альвеолой (рис. 3б–3г). На  $DP_4$  (экз. ПИН, № 5644/526) шесть маленьких эмалевых островков (по три на передней и задней долях жевательной поверхности). На  $M_1$  передний мезофлексид имеет узкий выход или замкнут, изолирован или соединен с антерофоссеттидом в единую складку подковообразной формы; лабиальный мезофоссеттид имеет обособленное положение; задний мезофлексид и гипофлексид разобщены; постерофлексид имеет узкий выход или замкнут.

На  $M_2$  открытый передний мезофлексид в лабиальной части сообщается с круговым фоссеттидом, полностью окружающим центральный конид; задний мезофлексид с широким выходом, лабиально может быть связан с круговым фоссеттидом (экз. ПИН, №№ 5644/527, 534); широкий постерофлексид объединен с гипофлексидом.

На экз. ПИН, № 5644/503 (стадия С) в левом и правом зубных рядах  $DP_4$  выпали,  $P_4$  находятся внутри альвеол, правый  $P_4$  в состоянии начального прорезывания (рис. 3д, 3е).  $M_1$  сильно стертые, с пятью эмалевыми островками и гипофлексидом.  $M_2$  умеренно стертые, имеют три незамкнутые складки – глубокий гипофлексид, хорошо развитый задний мезофлексид и постерофлексид



**Рис. 3.** *Hystrix refoffa* Gervais, 1852, нижние щечные зубные ряды разных стадий стирания с окклюзиальной стороны: а – экз. ПИН, № 5644/524, левые  $M_1-M_2$  (стадия A/B1), альвеолы  $DP_4$  и  $M_3$ ; б – экз. ПИН, № 5644/526, левые  $DP_4-M_3$  (стадия B1/B2); в – экз. ПИН, № 5644/527, правые  $M_1-M_3$  (стадия B1/B2), альвеолы  $DP_4$ ; г – экз. ПИН, № 5644/534, правые  $M_1-M_3$  (стадия B1/B2), альвеолы  $DP_4$ ; д, е – экз. ПИН, № 5644/503, левые  $M_1-M_3$  ( $P_4$  внутри альвеолы) и правые  $P_4-M_3$  (стадия C); ж – экз. ПИН, № 5644/535, правые  $P_4-M_3$  (стадия C/D1); з – экз. ПИН, № 5644/512, правые  $P_4-M_3$  (стадия D1); и, к – экз. ПИН, № 5644/504, левые и правые  $P_4-M_3$  (стадия D2); л – экз. ПИН, № 5644/522, левые  $P_4$  и  $M_2-M_3$  (стадия D2/E), альвеолы  $M_1$ ; м – экз. ПИН, № 5644/525, правые  $P_4-M_3$  (стадия D2/E); н – экз. ПИН, № 5644/509, правые  $P_4-M_2$  (стадия E), альвеола  $M_3$ ; о – экз. ПИН, № 5644/521, левые  $P_4-M_3$  (стадия E); п – экз. ПИН, № 5644/523, правые  $M_1-M_3$  (стадия E), альвеолы  $P_4$ ; р – экз. ПИН, № 5644/531, частично заросшие альвеолы левых  $P_4-M_3$ ; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

с узким устьем. Коронка  $M_3$  в состоянии прорезывания возвышается над лабиальной стенкой альвеолы, но ниже ее лингвальной стенки.

На экз. ПИН, № 5644/535 (стадия C/D1)  $P_4$  полностью прорезавшийся, практически не стертый (рис. 3ж).  $M_1$  с пятью замкнутыми долинками и глубоким гипофлексидом. Передний мезофоссеттид слит с лабиальным мезофоссеттидом в единую долинку. На  $M_2$  открыты гипофлексид и задний мезофлексид, постерофоссеттид замкнут. В передней половине жевательной поверхности находятся две крупных замкнутых долинки и ма-

ленький эмалевый островок.  $M_3$  в состоянии начального стирания.

Стадия D1 (экз. ПИН, № 5644/512) характеризуется замкнутыми долинками при сохранении глубоких гипофлексидов на  $P_4-M_2$ . На  $P_4$  четыре обширных субпоперечных долинки, на  $M_1$  – пять сравнительно небольших долинки, на  $M_2$  – три мелких эмалевых островка в антеролингвальной части, косая длинная долинка постеролабиальнее от них и две широкие субпоперечные долинки в задней части жевательной поверхности (рис. 3з).



**Рис. 4.** *Hystrix refossa* Gervais, 1852: а, б – экз. ПИН, № 5644/508, левая бедренная кость: а – с передней стороны, б – с задней стороны; в–е – экз. ПИН, № 5644/510, правая бедренная кость: в – с передней стороны, г – с медиальной стороны, д – с задней стороны, е – с латеральной стороны; ж–л – экз. ПИН, № 5644/511, левая бедренная кость: ж – с передней стороны, з – с медиальной стороны, и – с задней стороны, к – с латеральной стороны, л – то же, следы (ямки и бороздки) зубов хищника; Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен.

На  $M_3$  узкие выходы имеют задний мезофлексид и постерофлексид, гипофлексид глубокий.

На экз. ПИН, № 5644/504 левый и правый нижние зубные ряды демонстрируют стадию стирания D2 (рис. 3и, 3к). На  $P_4$  четыре эмалевых долинки и незамкнутый гипофлексид; на  $M_1$  – пять эмалевых складок (на левом зубе замкнутый гипофоссетид, на правом зубе выположенный гипофлексид с узким устьем, совмещенным с короткой бороздкой на лабиальной стороне); на  $M_2$  – четыре-

пять эмалевых островков и глубокий гипофлексид; на  $M_3$  – пять эмалевых островков и гипофлексид.

На стадии D2/E (экз. ПИН, №№ 5644/522, 525) гипофлексид сохраняется на  $P_4$  и  $M_3$  (или только на  $P_4$ ), но замкнут в гипофоссетид на  $M_1$  и  $M_2$  (рис. 3л, 3м).

На заключительной стадии E (экз. ПИН, №№ 5644/509, 521, 523) все эмалевые долинки (обычно их пять-шесть) замкнутые и имеют небольшие размеры (рис. 3н–3п).

**Таблица 2.** Размеры (в мм) нижних зубов и нижнечелюстной диастемы *Hystrix refoffa* Gervais, 1852 из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым (AL — альвеолярная длина; DL — длина диастемы; LD — продольный диаметр; OL — окклюзиальная длина; OW — окклюзиальная ширина; TD — поперечный диаметр; dex — правая кость; sin — левая кость)

Экземпляр ПИН, № (стадия стирания)	Зубной ряд и диастема	Зубы (резец: LD × TD; щечные зубы: OL × OW)
5644/524 (A/B1)	DL: 30.0	M <sub>1</sub> — 11.8 × 9.1
5644/526 (B1/B2)	AL DP <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 41.3; DL: 29.3	DP <sub>4</sub> — 9.9 × 7.1; M <sub>1</sub> — 10.6 × 7.8; M <sub>2</sub> — 10.7 × 7.0
5644/527 (B1/B2)	AL DP <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 41.6	M <sub>1</sub> — 10.9 × 7.6; M <sub>2</sub> — 10.8 × 7.2
5644/534 (B1/B2)	AL DP <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 43.5; DL: 28.0	M <sub>1</sub> — 11.8 × 8.5; M <sub>2</sub> — 10.0 × 6.5
5644/536 (B1/B2)	—	M <sub>1</sub> — 11.8 × 8.0
5644/503 (C)	AL DP <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 44.0 (dex), 40.1 (sin); DL: 32.9 (dex), 34.5 (sin)	I <sub>1</sub> : 7.5 × 6.6 (dex), 7.6 × 6.7 (sin); M <sub>1</sub> : 10.3 × 8.1 (dex), 10.0 × 8.2 (sin); M <sub>2</sub> : 11.0 × 8.5 (dex), 11.0 × 8.1 (sin); M <sub>3</sub> : 9.0 × 6.5 (dex)
5644/535 (C/D1)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 44.0; OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 41.7; DL: 33.5	I <sub>1</sub> — 8.6 × ?; P <sub>4</sub> — 11.0 × 7.2; M <sub>1</sub> — 10.0 × 8.1; M <sub>2</sub> — 11.0 × 8.2; M <sub>3</sub> — 9.5 × 6.1
5644/512 (D1)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 46.2; OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 43.0; DL: 33.5	P <sub>4</sub> — 12.0 × 8.8; M <sub>1</sub> — 10.5 × 9.2; M <sub>2</sub> — 11.1 × 9.6; M <sub>3</sub> — 9.5 × 8.0
5644/504 (D2)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 46.5 (dex), 45.0 (sin); OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 42.7 (dex), 42.0 (sin); DL: 38.2 (dex), 39.4 (sin)	I <sub>1</sub> — 8.0 × 7.0 (dex, sin); P <sub>4</sub> — 11.5 × 8.8 (dex), 11.5 × 8.6 (sin); M <sub>1</sub> : 10.2 × 8.0 (dex), 10.3 × 8.0 (sin); M <sub>2</sub> : 11.5 × 8.8 (dex), 11.7 × 9.2 (sin); M <sub>3</sub> : 10.4 × 7.8 (dex), 10.0 × 7.9 (sin)
5644/522 (D2/E)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 46.0; OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 42.4	P <sub>4</sub> — 13.0 × 9.8; M <sub>2</sub> — 11.0 × 11.0; M <sub>3</sub> — 9.7 × 9.6
5644/525 (D2/E)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 39.2; OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 38.5; DL: 36.2	P <sub>4</sub> — 11.5 × 8.6; M <sub>1</sub> — 7.9 × 8.7; M <sub>2</sub> — 9.9 × 8.8; M <sub>3</sub> — 9.0 × 7.1
5644/509 (E)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 42.9; DL: 38.5	P <sub>4</sub> — 13.4 × 10.0; M <sub>1</sub> — 8.2 × 9.4; M <sub>2</sub> — 10.6 × 9.7
5644/521 (E)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 44.5; OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 42.4; DL: 35.9	P <sub>4</sub> — 12.8 × 9.0; M <sub>1</sub> — 9.7 × 8.7; M <sub>2</sub> — 11.0 × 10.0; M <sub>3</sub> — 9.8 × 8.0
5644/523 (E)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : 45.0; DL: 28.5	I <sub>1</sub> — 8.6 × 7.3; M <sub>1</sub> — 10.2 × 8.6; M <sub>2</sub> — 11.5 × 9.0; M <sub>3</sub> — 10.0 × 7.9
5644/531 (без щечных зубов)	AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub> : ~38.8	I <sub>1</sub> — 8.8 × 7.6

Кости посткраниального скелета массивные, крупные. Бедренная кость (рис. 4) относительно широкая в диафизе, с крупной головкой, характерной относительно короткой шейкой, широким большим вертелом, мощными малым вертелом и межвертельным гребнем и массивным дистальным эпифизом — как у молодых (рис. 4а, 4б), так и у взрослых особей.

Размеры черепа приведены в табл. 1, нижней челюсти и зубов — в табл. 2, бедренной кости — в табл. 3.

Экз. ПИН, № 5644/555, OL × OW: P<sup>4</sup> — 9.8 × 7.8 (dex), 10.0 × 8.0 (sin); M<sup>1</sup> — 9.9 × 9.5 (dex), 9.8 × 9.6 (sin); M<sup>2</sup> — 10.1 × 9.6 (dex), 10.3 × 9.8 (sin); M<sup>3</sup> — 8.7 × 7.0 (dex), 8.8 × 7.0 (sin). Экз. ПИН,

№ 5644/501: AL DP<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> — 37.0; AL × AW: DP<sup>4</sup> — 8.5 × 11.5, M<sup>1</sup> — 9.0 × 10.0, M<sup>2</sup> — 9.5 × 9.8, M<sup>3</sup> — 9.5 × 7.7.

I<sup>1</sup> (экз. ПИН, № 5644/544): LD — 8.9, TD — 7.5. Стертый DP<sup>4</sup> (экз. ПИН, № 5644/532): OL — 11.1, OW — 14.1. Нестертый P<sup>4</sup> (экз. ПИН, № 5644/502): OL — 10.0; L — 11.8; OW — 7.8; W — 10.0; лингвальная эмалевая высота коронки — 23.2; высота гипострии — 4.0.

Нижнечелюстные кости: длина от переднего края резца до заднего края сочленовного отростка — 110.5 (экз. ПИН, № 5644/503, dex), 125.5 (экз. ПИН, № 5644/504, dex), 140.0 (экз. ПИН, № 5644/525); высота в сочленовном отростке — 41.2 (экз. ПИН, № 5644/534), 47.7 (экз. ПИН, № 5644/512), 50.8

**Таблица 3.** Размеры (в мм) бедренной кости *Hystrix refossa* Gervais, 1852 из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым

Параметр	Экземпляр ПИН, №		
	5644/508	5644/510	5644/511
Длина от головки до края дистального эпифиза	135.6	~148.0	151.0
Поперечный диаметр головки	21.3	25.8	24.7
Минимальный поперечный диаметр диафиза	20.0	22.1	21.9
Минимальный передне-задний диаметр диафиза	13.5	15.0	14.8
Максимальный передне-задний диаметр дистального эпифиза	43.0	44.5	40.9

(экз. ПИН, № 5644/525); высота с лингвальной стороны под  $DP_4/P_4$  – 22.2–31.9, под  $M_1$  – 22.6–29.2 ( $n = 15$ ); толщина спереди от нижнего массивного гребня – 12.5–17.1 ( $n = 15$ ).

**Изменчивость.** Отмеченные выше стадии прорезывания, смены и стирания зубов (рис. 3) позволяют разделить нижнечелюстной материал из пещеры Таврида на возрастные группы. Смена  $DP_4$  на  $P_4$  у современных дикобразов рода *Hystrix* происходит в возрасте около 1.5 лет, когда они достигают половой зрелости; с этой онтогенетической стадией соотносится стадия зубного стирания С [8]. По аналогии с современными *H. cristata* Linnaeus, 1758 и *H. africae australis* Peters, 1852 стадии А, В1, В2, D1, D2, Е сопоставляются соответственно с возрастными группами 0–5, 5–8, 8–18, 18–30, 30–48 мес и 4–12 лет [8]. С учетом данных по зубным возрастным классам *H. africae australis* [10, табл. 1], описанные выше стадии *H. refossa* рассматриваются в пределах шести возрастных групп: 5–6 мес (А/В1, ювенильные особи), 8–11 мес (В1/В2, молодые неполовозрелые особи), 18–23 (С, С/Д1), 24–30 (D1), 30–48 (D2) мес (С–D2, взрослые особи) и 4–12 лет (D2/Е, Е, стареющие взрослые и сенильные особи).

Нижнечелюстные кости более возрастных особей характеризуются большей общей длиной (стадия С – 110.5; стадия D2 – 125.5; стадия D2/Е – 140.0), более длинной диастемой (табл. 2), большей высотой в сочленовном отростке (стадия В1/В2 – 41.2; стадия D1 – 47.7; стадия D2/Е – 50.8) и на уровне передних щечных зубов (стадии А/В1 и В1/В2: под  $DP_4/P_4$  – 22.2–25.6, под  $M_1$  – 22.6–24.1; стадии С–Е: под  $DP_4/P_4$  – 25.0–31.9, под  $M_1$  – 26.5–29.2), а также большей массивностью и толщиной горизонтальной ветви (стадии А/В1 и В1/В2 – 12.5–13.7; стадии С–Е – 14.1–17.1).

Экз. ПИН, № 5644/531 (рис. 2и, 3р) демонстрирует аномально неглубокие альвеолы выпавших левых  $P_4$ – $M_3$ , частично заполненные пористой костной тканью. Особенно сильно выполо-

жена лунка  $M_1$ . Очевидно, данная особь при жизни утратила все щечные зубы в левой половине нижней челюсти, и зубные лунки начали заживать. Судя по размерам (высота горизонтальной ветви под  $P_4$  – 29.0, под  $M_1$  – 28.0, толщина – 16.2), это животное принадлежало к взрослой возрастной группе, однако причина выпадения у него щечных зубов неясна. Признаков периодонтита или травмы нет. С территории Сицилии (Италия) описан череп взрослого самца современного дикобраза *H. cristata* (Музей естественной истории Феррары, экз. № 21В) с зубными лунками левых  $P^4$ – $M^2$  аномально малой глубины (сами зубы утрачены при жизни) [11, рис. 2, 3]. В нижней челюсти отсутствуют правый  $P_4$  и его альвеола, а оба  $M_1$ , их корни и лунки сильно редуцированы (причем левый  $M_1$  выпал при жизни). Можно предположить, что в обоих случаях (экз. № 21В; экз. ПИН, № 5644/531) из-за генетических отклонений сформировались аномально короткие зубные корни, что привело к прижизненной утрате щечных зубов с последующим частичным зарастанием (цикватризацией) зубных лунок [см. 11, с. 223].

**Сравнение и замечания.** Согласно Д. Ван Веерсу [3], синонимами *H. refossa* являются *H. major* Gervais, 1859 (плейстоцен, Европа), *H. crassidens* Lydekker, 1886 (плейстоцен, Индия), *H. etrusca* Bosco, 1898 (ранний плейстоцен, Европа), *H. angressi* Frenkel, 1970 (поздний плейстоцен, Израиль), *H. gigantea* Van Weers, 1985 (поздний плейстоцен, Ява, Индонезия) и *H. magna* Pei, 1987 (плейстоцен, Китай). *H. makapanensis* Greenwood, 1958 из плио-плейстоцена Южной и Восточной Африки, также иногда рассматривавшийся как синоним *H. refossa* [2], в настоящее время обычно считается самостоятельным видом [12]. *H. refossa* четко отличается от других плейстоценовых дикобразов сочетанием крупных размеров и гипсодонтных щечных зубов. По степени гипсодонтности крупный дикобраз из Крыма (отношение эмалевой высоты коронки к длине жевательной

**Таблица 4.** Размеры (в мм) зубов *Hystrix refoffa* Gervais, 1852 из плейстоцена Европы и Передней Азии (AL – альвеолярная длина; OL – окклюзиальная длина; *n* – число экземпляров;  $\mu$  – среднее значение)

Параметр	Крым: пещера Таврида	Италия: Вальдарно [2], Пирро-Норд [18]	Израиль: пещера Геула [6, 7]
AL P <sup>4</sup> –M <sup>3</sup>	37.0–39.0 ( <i>n</i> = 3, $\mu$ = 38.2)	37.0–40.3 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 38.7) [2]	37.7–39.5 ( <i>n</i> = 4, $\mu$ = 38.7)
OL P <sup>4</sup> –M <sup>3</sup>	37.7–37.8 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 37.75)	39.7 ( <i>n</i> = 1) [2]	–
AL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub>	39.2–46.5 ( <i>n</i> = 9, $\mu$ = 44.7)	41.1 ( <i>n</i> = 1) [2]; 39.8–42.3 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 41.0) [18]	37.5–40.6 ( <i>n</i> = 9, $\mu$ = 38.5)
OL P <sub>4</sub> –M <sub>3</sub>	38.5–43.0 ( <i>n</i> = 7, $\mu$ = 41.8)	39.8 ( <i>n</i> = 1) [2]; 40.6 ( <i>n</i> = 1) [18]	–
OL P <sup>4</sup>	9.8–11.1 ( <i>n</i> = 4, $\mu$ = 10.2)	10.6–11.95 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 11.3) [18]	9.2–11.0 ( <i>n</i> = 24, $\mu$ = 10.3)
OL M <sup>1</sup>	9.8–9.9 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 9.85)	M <sup>1–2</sup> : 6.7–10.85 ( <i>n</i> = 13, $\mu$ = 9.2) [18]	6.8–10.0 ( <i>n</i> = 24, $\mu$ = 9.0)
OL M <sup>2</sup>	10.1–10.3 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 10.2)		7.8–11.0 ( <i>n</i> = 29, $\mu$ = 9.7)
OL M <sup>3</sup>	8.7–8.8 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 8.75)	6.7–10.05 ( <i>n</i> = 7, $\mu$ = 8.9) [18]	7.1–10.5 ( <i>n</i> = 28, $\mu$ = 9.0)
OL P <sub>4</sub>	11.0–13.4 ( <i>n</i> = 8, $\mu$ = 12.1)	11.9 ( <i>n</i> = 1) [18]	9.2–13.0 ( <i>n</i> = 42, $\mu$ = 10.9)
OL M <sub>1</sub>	7.9–11.8 ( <i>n</i> = 15, $\mu$ = 10.3)	M <sub>1–2</sub> : 8.75–10.4 ( <i>n</i> = 2, $\mu$ = 9.6) [18]	7.1–10.7 ( <i>n</i> = 28, $\mu$ = 9.1)
OL M <sub>2</sub>	9.9–11.7 ( <i>n</i> = 14, $\mu$ = 10.9)		8.4–11.0 ( <i>n</i> = 26, $\mu$ = 9.7)
OL M <sub>3</sub>	9.0–10.4 ( <i>n</i> = 9, $\mu$ = 9.65)	9.85–10.5 ( <i>n</i> = 3, $\mu$ = 10.1) [18]	8.3–11.0 ( <i>n</i> = 42, $\mu$ = 9.9)

поверхности для нестертого P<sup>4</sup> – 2.32) входит в интервал значений, свойственных *H. refoffa* (1.5–2.6) [2].

По строению и размерам черепа крупный дикобраз из пещеры Таврида соответствует раннеплейстоценовым *H. refoffa* из Европы [см. 13], но отличается от позднеплейстоценового *H. refoffa* (= *H. angressi*) из Израиля [см. 6, 7]. В числе отмеченных отличий более крупные размеры, субпараллельное положение верхних зубных рядов и субвертикальное положение длинной оси затылочных мышечков. В строении зубов крымский большой дикобраз отличается от израильской формы закрытой парафоссетой на нестертых и слабо стертых P<sup>4</sup>, а также изолированным положением лабиального мезофоссеттида и отсутствием связи заднего мезофлексиды с гипофлексидом на слабо стертых M<sub>1</sub>.

По длине зубных рядов (AL P<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> – 37.0–39.0; OL P<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> – 37.7–37.8; AL P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 39.2–46.5; OL P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 38.5–43.0) большой дикобраз из Тавриды соответствует *H. refoffa* (AL P<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> – 37.0–40.3; OL P<sup>4</sup>–M<sup>3</sup> – 39.7; AL P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 37.5–42.3; OL P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 39.8–42.0), но в случае нижних зубных рядов превосходит все известные выборки по максимальным и средним значениям [6, 7, 14, 15] (табл. 4). Нужно отметить, что некоторые сводные данные о размерах *H. refoffa* [15, табл. 1] неточны (в частности, окклюзиальная длина P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 43.5), так как, видимо, частично основаны на экземплярах других крупных вымерших видов дикобразов –

*H. primigenia* (Wagner, 1848) [см. 2, табл. 2] и *H. depereti* Sen, 2001 [см. 16].

Длина отдельных зубов (P<sup>4</sup> – 9.8–11.1; M<sup>1–2</sup> – 9.8–10.3; M<sup>3</sup> – 8.7–8.8; P<sub>4</sub> – 11.0–13.4; M<sub>1–2</sub> – 7.9–11.8; M<sub>3</sub> – 9.0–10.4) в целом отвечает крупным экземплярам *H. refoffa* (длина P<sup>4</sup> – 8.7–11.95; M<sup>1–2</sup> – 6.7–11.0; M<sup>3</sup> – 6.7–10.5; P<sub>4</sub> – 9.2–13.0; M<sub>1–2</sub> – 7.1–11.6; M<sub>3</sub> – 8.3–11.0) [6, 7, 15, 17, 18], хотя превосходит их по максимальным и средним значениям P<sub>4</sub> и M<sub>1–2</sub> (см. табл. 4). Значение изменчивости в размерах следует оценить при получении дополнительных материалов по европейским представителям вида.

*Hystrix refoffa* примерно на 20% крупнее современных *H. indica* (Kerr, 1792) [4] и *H. cristata* L., 1758. Кроме того, для *H. refoffa* характерны очень массивные кости посткраниального скелета, даже по сравнению с крупными позднемиоценовыми формами *H. primigenia* и *H. depereti*. Вероятно, более тяжелое телосложение (как и гипсодонтные зубы) *H. refoffa* связано с адаптацией к жизни в сухих и открытых ландшафтах [17, 18]. При этом по величине зубов *H. refoffa* уступал *H. depereti* из терминального миоцена Франции (AL P<sub>4</sub>–M<sub>3</sub> – 49.5–50.5; OL M<sub>1–2</sub> – 10.9–14.0, *n* = 10,  $\mu$  = 12.1), *H. paukensis* из мио-плиоцена Мьянмы (OL P<sub>4</sub> – 15.06; OL M<sub>1</sub> – 11.97; OL M<sub>2</sub> – 11.56; OL M<sub>3</sub> – 11.13) и *Xenohystrix crassidens* из плиоцена Южной и Восточной Африки (OL P<sub>4</sub> – 14.0–17.0, *n* = 3,  $\mu$  = 15.7; OL M<sub>1</sub> – 14.0; OL M<sub>2</sub> – 14.5) [16, 19, 20].

Остатки нескольких разновозрастных особей *H. refossa* (экз. ПИН, №№ 5644/503, 504, 508) были найдены в пещере Таврида совместно, что позволяет предположить их первичную концентрацию в пределах логова или норы плейстоценовых дикобразов. Часть костей (например, экз. ПИН, №№ 5644/504, 509, 522, 524, 527, 531) несет следы погрызов, видимо, оставленные *H. (A.) vinogradovi* и мелкими грызунами (рис. 2в, 2г, 2з, 2и); очевидно, до захоронения в осадке кости некоторое время оставались на поверхности. Особенно примечательна находка бедренной кости (экз. ПИН, № 5644/511) с явственными отметинами (ямками и бороздками) от зубов хищного млекопитающего (рис. 4ж–4л).

**Распространение.** Поздний плиоцен (MN16a) – плейстоцен Евразии.

**Материал.** Из пещеры Таврида неполный череп с обоими рядами щечных зубов (экз. ПИН, № 5644/555), фрагменты черепов (экз. ПИН, №№ 5644/500, 550), фрагмент предчелюстной кости с I<sup>1</sup> (экз. ПИН, № 5644/544), фрагменты верхнечелюстных костей без зубов (экз. ПИН, №№ 5644/501, 543), изолированный DP<sup>4</sup> (экз. ПИН, № 5644/532), изолированный P<sup>4</sup> (экз. ПИН, № 5644/502), парные нижнечелюстные кости (экз. ПИН, №№ 5644/503, 504), нижнечелюстные кости и их фрагменты (экз. ПИН, №№ 5644/509, 512, 521–527, 531, 534–536), атлант (экз. ПИН, № 5644/505), эпистрофей (экз. ПИН, № 5644/506), фрагмент плечевой кости (экз. ПИН, № 5644/515), локтевые кости и их фрагменты (экз. ПИН, №№ 5644/507, 513, 516, 519), бедренные кости и их фрагменты (экз. ПИН, №№ 5644/508, 510, 511, 518) и другие кости посткраниального скелета.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен А.В. Лаврову (ПИН), Д.О. Гимранову (Институт экологии растений и животных УрО РАН) и Д.Б. Старцеву (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского) за сбор материалов в 2020 г., С.В. Багирову и А.М. Кузнецову (ПИН) за помощь в подготовке фотографий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В. Дикобраз *Hystrix (Acanthion) vinogradovi* (Rodentia, Hystricidae) из раннеплейстоценового местонахождения Таврида в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 486. № 6. С. 756–762.
2. Van Weers D.J. The porcupine *Hystrix refossa* Gervais, 1852 from the Plio-Pleistocene of Europe, with notes on other fossil and extant species of the *Hystrix* // Scripta Geologica. 1994. V. 106. P. 35–52.
3. Van Weers D.J. A taxonomic revision of the Pleistocene *Hystrix* (Hystricidae, Rodentia) from Eurasia with notes on the evolution of the family // Contributions to Zoology. 2005. V. 74. № 3/4. P. 301–312.
4. Lazaridis G., Tsoukala E., Maul L.C. The earliest *Hystrix refossa*: a new Early Villafranchian record from Milia (Grevena, Macedonia, Greece) // Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy. 2019. V. 30. № 1. P. 12–18.
5. Тоначевский В.А. Грызуны таманского фаунистического комплекса Крыма. Київ: Наук. думка, 1973. 235 с.
6. Frenkel H. *Hystrix angressi* sp. nov. a large fossil porcupine from the Levallois-Mousterian of the Geula Cave // Israel Journal of Zoology. 1970. V. 19. № 1. P. 51–82.
7. Monchot H., Fernandez P., Gaillard J.-M. Paleodemographic analysis of a fossil porcupine (*Hystrix refossa* Gervais, 1852) population from the Upper Pleistocene site of Geula Cave (Mount Carmel, Israel) // Journal of Archaeological Science. 2012. V. 39. P. 3027–3038.
8. Gervais P. Fossiles dans les alluvions sous-volcanique de la montagne de Perrier, aux environs d'Issoire (Puy-de-Dôme) // Zoologie et paléontologie française. V. 1–3. Paris: A. Bertrand, 1848–1852. P. 1–271.
9. Wang B.Y., Qiu Z.D. New *Hystrix* (Hystricidae, Rodentia) from the Neogene of Linxia Basin, Gansu, China // Vertebrata Palasiatica. 2020. V. 58. № 3. P. 204–220.
10. Van Aarde R.J. Age determination of Cape porcupines, *Hystrix africae australis* // South African Journal of Zoology. 1985. V. 20. № 4. P. 232–236.
11. Angelici F.M., Luiselli L. Extra teeth and dental anomalies in the crested porcupine *Hystrix cristata*, from Sicily // Acta Theriologica. 1999. V. 44. № 2. P. 219–223.
12. Adams J.W. Craniodental and postcranial remains of the extinct porcupine *Hystrix makapanensis* Greenwood, 1958 (Rodentia: Hystricidae) from Gondolin, South Africa // Annals of the Ditsong National Museum of Natural History. 2012. V. 2. № 1. P. 7–17.
13. Bosco C. *Hystrix etrusca* n. sp. // Paleontografia Italiana. 1889. V. 4. P. 141–153.
14. Vekua A., Bendukidze O., Bukhsianidze M., et al. Porcupine in the Late Neogene and Quaternary of Georgia // Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences. 2010. V. 4. № 3. P. 140–149.
15. Salari L., Sardella R. Il genere *Hystrix* Linnaeus, 1758 in Italia // Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Memorie Ser. A. 2011. V. 116. P. 171–178.
16. Sen S. Early Pliocene porcupine (Mammalia, Rodentia) from Perpignan, France: a new systematic study // Geodiversitas. 2001. V. 23. № 2. P. 303–312.
17. Rook L., Sardella R. *Hystrix refossa* Gervais, 1852 from Pirro Nord (Early Pleistocene, Southern Italy) // Rivista Italiana di Paleontologia e Stratigrafia. 2005. V. 111. № 3. P. 489–496.
18. Rook L., Sardella R. New data on the Early Pleistocene large sized porcupine from Pirro Nord (Apricena, Apulia, Italy) // Palaeontographica. Abt. A. 2013. V. 298. № 1–6. P. 87–94.
19. Nishioka Y., Zin-Maung-Maung-Thein, Egi N., et al. New *Hystrix* (Mammalia, Rodentia) from the Late Miocene/Early Pliocene of Myanmar // Journal of Vertebrate Paleontology. 2011. V. 31. № 4. P. 919–924.
20. Greenwood M. Fossil Hystricoidea from the Makapan Valley, Transvaal // Palaeontologia Africana. 1955. V. 3. P. 77–85.

**THE LARGE PORCUPINE *HYSTRIX REFOSSA* (RODENTIA, HYSTRICIDAE)  
FROM THE EARLY PLEISTOCENE TAURIDA LOCALITY IN CRIMEA****Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>a, #</sup>**<sup>a</sup> *Borissiak Paleontological Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*  
#e-mail: *alopat@paleo.ru*

The remains of large porcupines (an incomplete skull, cranial and mandibular fragments, isolated teeth and postcranial bones) from the Early Pleistocene Taurida cave locality in central Crimea (Belogorsk district, Zuya village) are referred to the species *Hystrix (Hystrix) refossa* Gervais, 1852, which was not been reported from Crimea previously. Based on the stages of eruption, replacement and attrition of the lower dentition, the presence of individuals of six age categories, from juvenile to senile, was established. One dentary shows an intravital loss of cheek teeth, presumably caused by abnormal development of their roots and sockets.

*Keywords:* *Hystrix refossa*, Hystricidae, Rodentia, Old World porcupines, Early Pleistocene, Crimea, Taurida cave, age categories, dental anomalies

УДК 569.742.1:551.793(477.75)

## ПЛЕЙСТОЦЕНОВЫЕ ЛИСИЦЫ (*VULPES*, CANIDAE, CARNIVORA) ИЗ ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА, КРЫМ

© 2021 г. Д. О. Гимранов<sup>1,2,\*</sup>, С. Бартолини-Лученти<sup>3,4</sup>, А. В. Лавров<sup>5</sup>,  
Б. А. Вахрушев<sup>6</sup>, академик РАН А. В. Лопатин<sup>5</sup>

Поступило 20.05.2021 г.  
После доработки 19.06.2021 г.  
Принято к публикации 19.06.2021 г.

Из раннеплейстоценового местонахождения пещера Таврида (Крым, поздний виллафранк, возраст 1.8–1.5 млн. лет) описаны фрагмент нижней челюсти и четыре изолированных зуба ископаемых лисиц: *Vulpes alopecoides* (Del Campa, 1913), *Vulpes* cf. *vulpes* (Linnaeus, 1758) и *Vulpes* sp. На основании размерных и морфологических характеристик установлено, что фрагмент нижней челюсти и два М1 принадлежат *V. alopecoides*. Строение m1 *Vulpes* cf. *vulpes* сходно с *V. vulpes* и *V. alopecoides*, но размеры намного превосходят известные пределы изменчивости последнего вида. Строение m1 *Vulpes* sp. является уникальным среди плейстоценовых представителей рода *Vulpes*, хотя по размерам зуб соответствует m1 *V. alopecoides*.

**Ключевые слова:** *Vulpes alopecoides*, поздний виллафранк, пещера Таврида, Крым, зубы, М1, m1

**DOI:** 10.31857/S2686738921050127

В составе раннеплейстоценового комплекса хищных млекопитающих из пещеры Таврида в Крыму, открытой в 2018 г. [1, 2], представлены семейства Felidae, Ursidae, Nyaenidae и Canidae [3–5]. Костные остатки лисиц (род *Vulpes*, Canidae) были собраны в ходе раскопок в 2018 и 2020 г. Они представлены фрагментом нижней челюсти и четырьмя изолированными зубами (рис. 1–3), которые хранятся в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН), Москва, и Институте экологии растений и животных УрО РАН (ИЭРЖ), Екатеринбург. Описания и измерения зубов проведены по ранее предложенной методике [6]. Измерения (L – длина, W – ширина) в мм, проведены с помощью цифрового штангенцир-

куля с точностью 0.01 мм. Сравнение размеров зубов проиллюстрировано диаграммами (рис. 4).

Два изолированных первых верхних моляра на основании размеров и строения отнесены к *Vulpes alopecoides* (Del Campa, 1913). Строение коронки и корней левого М1 (экз. ИЭРЖ, № 727/98) и правого М1 (экз. ИЭРЖ, № 727/97) идентично (рис. 1), их размеры имеют очень близкие значения (экз. ИЭРЖ, № 727/97: L – 7.61, W – 10.13; экз. ИЭРЖ, № 727/98: L – 7.60, W – 10.18). Зубы найдены недалеко друг от друга в одном слое на одном участке пещеры, они нестертые и имеют одинаковый светло-желтый цвет. На основании этих данных мы предполагаем, что левый и правый М1 принадлежали одной особи. Зубы трехкорневые, вытянутые букколингвально. Паракон несколько больше метакона, имеется небольшой, но хорошо различимый парастиль. Метастиль не развит. Имеется четко выраженный буккальный цингулом. Протокон хорошо развит, протоконуль и метаконуль отсутствуют, имеется развитая постпротокрита. Гипокон небольшой по площади, высокий, равен по высоте протокону. Имеется прерывистый мезиальный цингулом, дистальный цингулом отсутствует. Бассейн тригона больше и глубже, чем бассейн талона.

Найденные М1 (экз. ИЭРЖ, №№ 727/97, 98) имеют морфологические признаки, характерные для *V. alopecoides*: зубы вытянуты букколингвально, паракон М1 больше метакона, протокон хорошо развит, имеется развитая постпротокрита

<sup>1</sup> Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

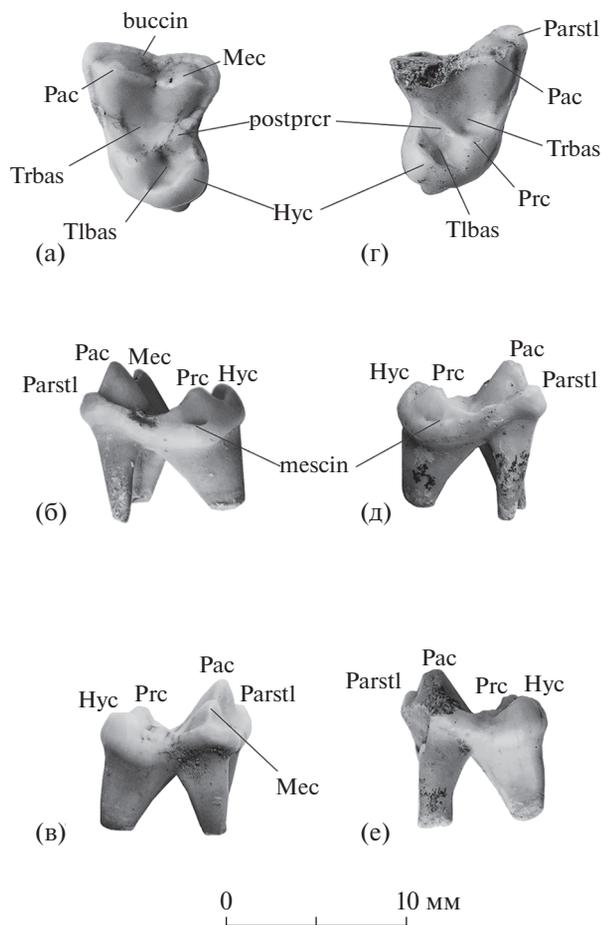
<sup>3</sup> Флорентийский университет, Отдел наук о Земле, Флоренция, Италия

<sup>4</sup> Отдел геологии и палеонтологии музея естественной истории Флорентийского университета, Флоренция, Италия

<sup>5</sup> Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН, Москва, Россия

<sup>6</sup> Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

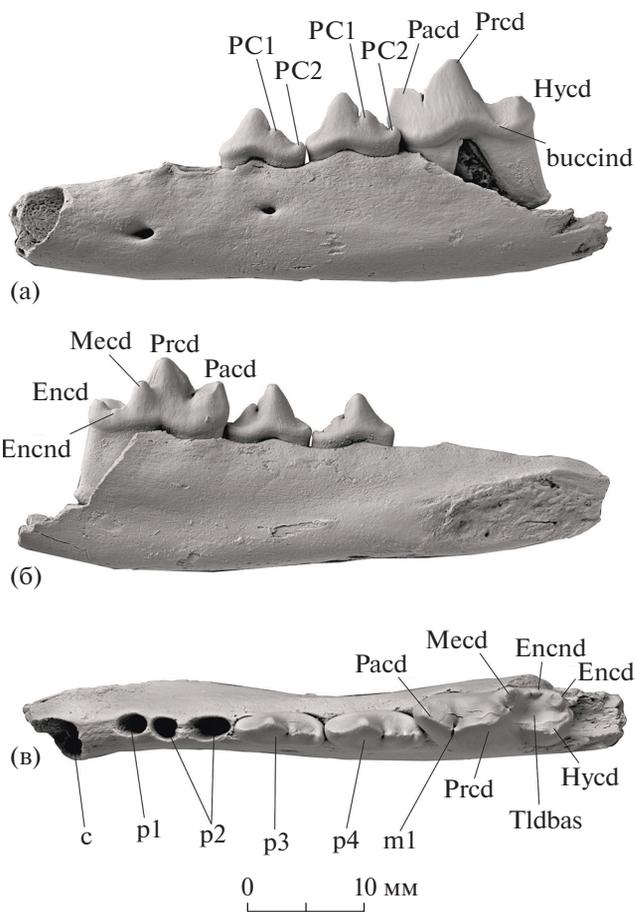
\*e-mail: djulfa250@rambler.ru



**Рис. 1.** *Vulpes alopecoides* (Del Campana, 1913): а–в – экз. ИЭРЖ, № 727/98, левый М1: а – с окклюзиальной стороны, б – с мезиальной стороны, в – с дистальной стороны; г–е – экз. ИЭРЖ, № 727/97, правый М1: г – с окклюзиальной стороны, д – с мезиальной стороны, е – с дистальной стороны; Крым, местонахождение Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: buccin – буккальный цингулюм, Hyc – гипокон, Mec – метакон, mescin – мезиальный цингулюм, Pac – паракон, Parstl – парастиль, postprcr – постпротокрита, Prc – протокон, Tlbas – бассейн талона (гипокона), Trbas – бассейн тригона.

и крупный гипокон с глубоким бассейном, также имеется мезиальный цингулюм [6]. Размеры М1 входят в пределы изменчивости таковых у *V. alopecoides* (рис. 4).

Фрагмент левой горизонтальной ветви нижней челюсти (экз. ПИН, № 5644/92) на основании размеров и строения m1 также отнесен к *V. alopecoides*. У этого экземпляра (рис. 2) утрачены резцовая часть и восходящая ветвь, а тело нижней челюсти обломано на уровне контакта m1 и m2. Переднее подбородочное отверстие расположено на уровне альвеолы переднего корня р2, заднее подбородочное отверстие – на уровне заднего корня р3. Сохранились р3, р4 и m1 и альвеолы клыка, р1 и р2. Первый премоляр р1 однокорне-



**Рис. 2.** *Vulpes alopecoides* (Del Campana, 1913), экз. ПИН, № 5644/92, фрагмент левой нижнечелюстной кости: а – с буккальной стороны, б – с лингвальной стороны, в – с окклюзиальной стороны; Крым, местонахождение Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: buccind – буккальный цингулид, Encd – энтоконид, Encnd – энтоконулид, Hycd – гипоконид, Mecd – метаконид, Pacd – параконид, PC1 – первый задний дополнительный бугорок, PC2 – второй задний дополнительный бугорок, Prcd – протоконид, Tldbas – бассейн талонида.

вой. Передний корень р2, р3 и р4 немного меньше заднего. Премоляры узкие и имеют по два задних дополнительных бугорка. Второй задний дополнительный бугорок на р3 и р4 цингулярный.

Челюсть принадлежит взрослой особи, так как вершины главных бугорков на зубах (протокониде премоляров и m1, паракониде, метакониде, гипокониде и энтокониде m1) заметно стертые (рис. 2). Особенности морфологии m1 соответствуют таковым *V. alopecoides*. Он двухкорневой, передний корень больше заднего. Разница в высоте паракониде и протокониде не очень значительна. Длина протокониде (4.4 мм) ненамного больше длины паракониде (3.9 мм). Метаконид большой и четко отделен от протокониде. Талонид занимает 33% длины зуба. Поперечный кристид (трансверсаль-

ный гребень) не выражен. Буккальный цингулид выражен на уровне от задней части протоконида до задней части гипоконид. Гипоконид и энтоконид крупные, последний меньше по размеру, бассейн талонида развитый, закрыт лингвально энтоконулидом [6]. Размеры m1 (экз. ПИН, № 5644/92): L – 12.30, W – 4.89 (см. рис. 4).

Левый m1 (экз. ПИН, № 5644/88) по строению коронки не отличается от *V. alopecoides* и *V. vulpes* Linnaeus, 1758 (рис. 3а–3в). По длине и ширине (L – 16.69, W – 6.08) он значительно больше средних размеров *V. alopecoides* и ближе к таковым современных *V. vulpes* (рис. 4). Зуб двухкорневой, нестертый. Параконид значительно ниже протоконид. Протоконид (6.6 мм в длину) немного длиннее параконида (5.4 мм). Метаконид довольно крупный и четко отделен от протоконид. Талонид занимает 30% длины зуба. Гипоконид крупный. Энтоконид высокий, крупный, немного уступает по размерам гипокониду. Бассейн талонида хорошо развит, закрыт лингвально отчетливым энтоконулидом. Задний гребень гипоконида (постгипокристингид) раздваивается в своем основании. Имеется четкий поперечный кристингид (рис. 3а).

Морфологические характеристики левого m1 (экз. ПИН, № 5644/88) не выходят за пределы изменчивости *V. alopecoides* и *V. vulpes*: метаконид достаточно большой и четко отделен от протоконид, гипоконид крупный, энтоконид высокий, но уступает по размеру гипокониду, бассейн талонида развитый, закрыт лингвально энтоконулидом, имеется поперечный кристингид [6]. Размеры зуба сходны с таковыми современной обыкновенной лисицы (*V. vulpes*). Учитывая ограниченное число экземпляров и возможность смешения разновозрастных плейстоценовых материалов, мы не рассматриваем эту находку (экз. ПИН, № 5644/88) как самое раннее свидетельство появления *V. vulpes* в геологической летописи, но определяем ее систематическое положение как *Vulpes cf. vulpes*.

Правый m1 (экз. ПИН, № 5644/87; L – 13.10, W – 4.97) по размерам близок к m1 *V. alopecoides* (рис. 4), но строение этого зуба не имеет аналогов среди известных представителей *Vulpes* (рис. 3г–3е). Зуб нестертый, двухкорневой, передний корень больше заднего. Разница в высоте параконида и протоконид не так значительна, как у экз. ПИН, № 5644/88. Длина протоконид (6.1 мм) в 1.5 раза больше длины параконида (4.1 мм). Метаконид большой и четко отделен от протоконид. Тригонид удлинен, талонид редуцирован и занимает 22% длины зуба. Гипоконид очень крупный, несколько смещен центрально. Энтоконид сильно редуцированный, смещен в дисталингуальный угол талонида. Бассейн талонида маленький. Крохотный энтоконулид не закрывает бассейн талонида с лингвальной стороны. Поперечный кристингид отсут-

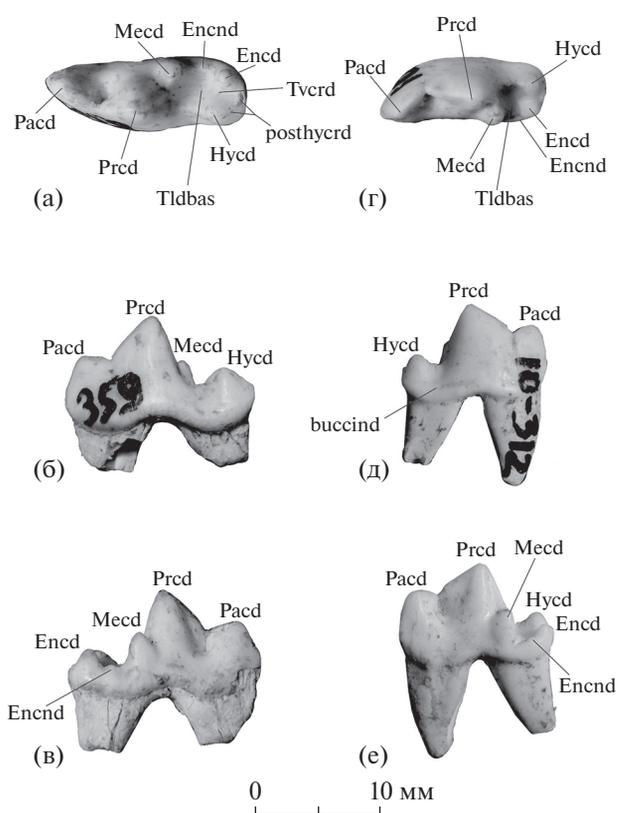
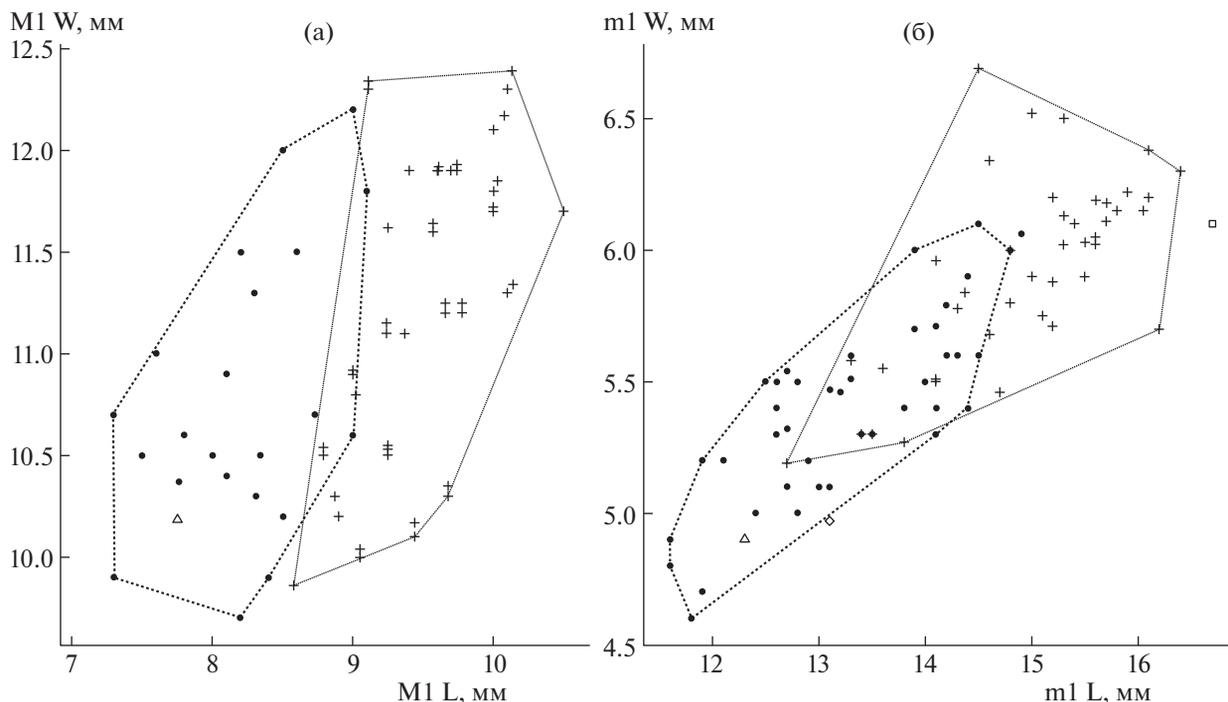


Рис. 3. Лисицы из пещеры Таврида: а–в – *Vulpes cf. vulpes* Linnaeus, 1758, экз. ПИН, № 5644/88, левый m1: а – с окклюзиальной стороны, б – с буккальной стороны, в – с лингвальной стороны; г–е – *Vulpes* sp., экз. ПИН, № 5644/87, правый m1: г – с окклюзиальной стороны, д – с буккальной стороны, е – с лингвальной стороны; Крым, местонахождение Таврида; плейстоцен. Обозначения: posthycr – постгипокристингид, Tvcrd – поперечный кристингид; др. см. рис. 2.

ствует. Буккальный цингулид выражен на уровне от задней части протоконид до задней части гипоконида.

Пропорции основных бугров и морфология правого m1 (экз. ПИН, № 5644/87) резко отличаются от свойственных для *V. alopecoides* и других древних лисиц [см. 6]. Особенно значимыми признаками являются увеличенная длина протоконид по сравнению с параконидом и короткий талонид. Также важной характеристикой является крупный гипоконид, смещенный несколько центрально. Еще одним существенным признаком является рудиментарный энтоконид. Три перечисленных признака m1 (экз. ПИН, № 5644/87) указывают на гиперкарниворную специализацию этой ископаемой лисицы. Ни один из описанных ранее плейстоценовых видов лисиц не имеет такого комплекса морфологических особенностей m1. Подобная гиперкарнивория нижних хищнических зубов известна для *V. qiuzhudingi* Wang et al., 2014 и *V. rooki* Bartolini Lucenti, 2021 из раннего



**Рис. 4.** Сравнение размеров зубов некоторых представителей рода *Vulpes*: а — отношение длины (L) к ширине (W) M1 у *V. alopecoides* (Del Campana, 1913) (круг, данные по [6]), современных *V. vulpes* Linnaeus, 1758 Евразии (крест) и *V. alopecoides* (экз. ИЭРЖ, № 727/98) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида (треугольник); б — отношение длины (L) к ширине (W) m1 у *V. alopecoides* (круг, данные по [6]), современных *V. vulpes* Евразии (крест), *V. alopecoides* (экз. ПИН, № 5644/92) из плейстоцена пещеры Таврида (треугольник), *Vulpes* sp. (экз. ПИН, № 5644/87) из плейстоцена пещеры Таврида (ромб) и *Vulpes* cf. *vulpes* (экз. ПИН, № 5644/88) из плейстоцена пещеры Таврида (квадрат).

плиоцена Китая [7, 8]. *V. qiuzhudingi* также имеет очень крупный гипоконид, который, в отличие от экз. ПИН, № 5644/87, занимает значительную площадь талонидного бассейна m1. В этом отношении экземпляр из Тавриды ближе к *V. rooki*, у которого энтоконид редуцирован не так сильно, как у *V. qiuzhudingi*. При этом m1 *V. qiuzhudingi* и *V. rooki* значительно крупнее; кроме того, у этих двух видов сильнее редуцированы метаконид и энтоконид.

Таким образом, морфологические особенности описанного m1 (экз. ПИН, № 5644/87) не позволяют отнести его к какому-либо известному виду древних лисиц. Объем доступного для описания материала явно недостаточен для выделения нового вида, поэтому данная форма рассматривается здесь как *Vulpes* sp.

Образцы из пещеры Таврида, отнесенные к представителям рода *Vulpes*, не очень многочисленны, но их морфологические и морфометрические особенности достаточно интересны. До недавнего времени считалось, что в раннем — среднем плейстоцене Европы существовали три вида лисиц: *V. praecorsac* Kormos, 1932, *V. praeglacialis* (Kormos, 1932) и *V. alopecoides* (Del Campana, 1913). Новейшие исследования [6] показали, что эти виды демонстрируют морфологические характери-

стики, соответствующие внутривидовой изменчивости современных видов *Vulpes*; на этом основании был сделан вывод, что они должны быть объединены в один вид *V. alopecoides*.

Присутствие *V. alopecoides* в отложениях пещеры Таврида соответствует определению возраста фаунистического комплекса в интервале 1.8–1.5 млн л.н. (поздний виллафранк, MNQ18–MNQ19) [см. 1, 9, 10]. Ранее костные остатки лисицы, сходной с *V. alopecoides*, были обнаружены на Кавказе в пещере Кударо 1 (Южная Осетия, средний плейстоцен) [11, 12]. Они были отнесены к *V. praeglacialis*, т.е. к виду, который ныне считается младшим синонимом *V. alopecoides* [6].

Находка *V. alopecoides* в нижнеплейстоценовых отложениях пещеры Таврида является первым достоверным свидетельством обитания этого вида в Крыму. Экз. ПИН, № 5644/87 может представлять собой своеобразный и неизвестный в настоящее время вид рода *Vulpes* из раннего плейстоцена Евразии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В., и др. Пещера Таврида — новое местонахождение ранне-

- плейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
2. Zelenkov N.V., Lavrov A.V., Startsev D.B., et al. A giant early Pleistocene bird from Eastern Europe: unexpected component of terrestrial faunas at the time of early *Homo* arrival // Journal of Vertebrate Paleontology. 2019: e1605521.
  3. Лавров А.В., Гимранов Д.О., Старцев Д.Б., Зайцев Б.А. Саблезубые кошки (Carnivora, Felidae, Machairodontinae) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым // Доклады РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 495. № 1. С. 567–571.
  4. Гимранов Д.О., Лавров А.В., Старцев Д.Б., и др. Первая находка этрусского медведя (*Ursus etruscus*, Ursidae, Carnivora) в Крыму (пещера Таврида, ранний плейстоцен) // Доклады РАН. Науки о жизни. 2020. Т. 491. № 1. С. 130–133.
  5. Лавров А.В., Гимранов Д.О., Старцев Д.Б., Лопатин А.В. Гигантская гиена *Pachycrocuta brevirostris* (Hyaenidae, Carnivora) из нижнего плейстоцена пещеры Таврида, Крым // Доклады РАН. Науки о жизни. 2021. Т. 496. № 1. С. 10–14.
  6. Bartolini Lucenti S., Madurell-Malapeira J. Unraveling the fossil record of foxes: an updated review on the Pliocene-Pleistocene *Vulpes* spp. from Europe // Quaternary Science Reviews. 2020. V. 236. 106296.
  7. Wang X., Tseng Z., Li Q., et al. From ‘third pole’ to north pole: a Himalayan origin for the arctic fox // Proceedings of the Royal Society B. 2014. V. 281. № 1787: 20140893.
  8. Bartolini Lucenti S. A new large-sized Pliocene fox (Carnivora, Canidae) from Yushe basin (Shanxi, China) // Rivista Italiana di Paleontologia e Stratigrafia. 2021. V. 127. № 1. P. 133–147.
  9. Вислобокова И.А., Тумов В.В., Лавров А.В., и др. О находке большерогого оленя рода *Arvernoceros* в пещере Таврида в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 487. № 5. С. 596–599.
  10. Вислобокова И.А., Тумов В.В., Лавров А.В., и др. Раннеплейстоценовые винторогие антилопы (*Artiodactyla*, Bovidae) из пещеры Таврида (Крым, Россия) // Палеонтологический журнал. 2020. № 1. С. 78–88.
  11. Baryshnikov G. Pleistocene Canidae (Mammalia, Carnivora) from Paleolithic sites in Kudaro caves in the Caucasus // Russian Journal of Theriology. 2012. V. 11. № 2. P. 77–120.
  12. Барышников Г.Ф. Крупные млекопитающие кударской плейстоценовой фауны Кавказа. СПб.: Наука, 2020 (Тр. Зоол. ин-та РАН. Прил. 9).

## PLEISTOCENE FOXES (*VULPES*, CANIDAE, CARNIVORA) FROM THE TAURIDA CAVE, CRIMEA

D. O. Gimranov<sup>a,b,#</sup>, S. Bartolini Lucenti<sup>c,d</sup>, A. V. Lavrov<sup>e</sup>,  
B. A. Vakhrushev<sup>f</sup>, and Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Department of Earth Sciences, University of Florence, Florence, Italy

<sup>d</sup> Geology and Paleontology Section of the Natural History Museum, University of Florence, Florence, Italy

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

<sup>f</sup> Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: djulfa250@rambler.ru

A mandible fragment and four isolated teeth of the fossil foxes, *Vulpes alopecoides* (Del Campana, 1913), *Vulpes* cf. *vulpes* (Linnaeus, 1758) and *Vulpes* sp., are described from the Early Pleistocene locality of Taurida cave (Crimea, Late Villafranchian, 1.8–1.5 Ma). Based on the size and morphological features, a mandible fragment and two M1 are attributed to *V. alopecoides*. The structure of m1 of *Vulpes* cf. *vulpes* is similar to that of *V. vulpes* and *V. alopecoides*, but the size greatly exceeds the size limits for the latter species. Although m1 of *Vulpes* sp. fits the size of the lower carnassials of *V. alopecoides*, its morphology is definitely unique among the Early Pleistocene representatives of the genus *Vulpes*.

**Keywords:** *Vulpes alopecoides*, *Vulpes*, Late Villafranchian, Taurida cave, Crimea, teeth, M1, m1

УДК 56.01/08:551.72:550.47:54.061

## ДРЕВНЕЙШИЕ ЭУКАРИОТЫ ЛАХАНДИНСКОЙ БИОТЫ (МЕЗОПРОТЕРОЗОЙ, ЮГО-ВОСТОЧНАЯ СИБИРЬ) – МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОГЕОХИМИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

© 2021 г. Ю. В. Шувалова<sup>1,2,\*</sup>, К. Е. Наговицин<sup>3,4</sup>, Я.-П. Дуда<sup>5</sup>, П. Ю. Пархаев<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН А. В. Лопатиным

Поступило 11.05.2021 г.

После доработки 31.05.2021 г.

Принято к публикации 31.05.2021 г.

Мезопротерозойская лахандинская серия (~1030 млн лет) содержит богатейшую доэдиакарскую биоту, из которой описаны более 20 видов эукариот, но степень достоверности их принадлежности к ядерным организмам различна. Семь из этих таксонов можно уверенно отнести к эукариотам, используя современные критерии определения эукариотических организмов в ископаемой летописи. К ним относятся ранее описанные *Valeria lophostriata*, *Trachyhystrichosphaera aimika*, *Aimonema ramosa*, *Palaeovaucheria clavata*, *Caudosphaera expansa*, *Germinosphaera bispinosa* и *Jacutianema solubila*. Выявлена новая спорангиеподобная ископаемая форма, близкая к возможным высшим грибам рода *Ourasphaira*, известного из (?) мезо- и неопротерозойских отложений Арктической Канады. Эукариотическая природа восьми вышеперечисленных ископаемых не вызывает сомнений в связи со сложностью их морфологии и крупными размерами. В то же время проведенный анализ органического вещества пород лахандинской серии показывает полное отсутствие в них стеранов – диагностических биомаркеров эукариот. Полученные результаты подтверждают гипотезу о подчиненной роли эукариот в функционировании морских экосистем мезопротерозоя. Исследование акцентирует внимание на ограничениях в использовании биомаркеров для интерпретации систематического положения ископаемых остатков из отложений, подвергшихся термическому воздействию.

**Ключевые слова:** лахандинская биота, эукариоты, биомаркеры, мезопротерозой

**DOI:** 10.31857/S2686738921050292

### ВВЕДЕНИЕ

Радиация древнейших эукариот является одним из важнейших этапов в эволюции биосферы Земли. Для исследования особенностей этого эволюционного события мезопротерозойская эра (1600–1000 млн лет) представляет особый интерес. Первые достоверные эукариотические организмы появились на границе палео- и мезопротерозоя (~1600 млн лет) – они известны из отложений Австралии, Китая и Индии [1, 2] и представлены остатками, вероятно, ствольных

линий эукариот, в подавляющем большинстве объединяющими в себе признаки различных филогенетически удаленных групп, а порой не имеющими аналогов среди современных организмов. К концу мезопротерозоя – началу неопротерозоя (~1000 млн лет) среди эукариот появляются формы, которые можно уверенно относить к кроновым ветвям филогенетического дерева домена (рис. 1). К их числу принадлежат красные водоросли *Bangiomorpha pubescens* Butterfield, 2000 (Rhodophyceae), зеленые водоросли *Proterocladus antiquus* Tang et al., 2020 (Chloroplastida), а также грибы *Ourasphaira giraldae* Loran et al., 2019 (Nucleotmycea) [1–4]. Отложения средней части неопротерозоя богаты остатками систематически разнообразных эукариот, включая первые формы с минеральным скелетом [1, 5].

Несмотря на постоянно пополняющийся архив ископаемой летописи эукариот, филогенетические взаимоотношения их древнейших представителей остаются неясными. Также сейчас довольно сложно оценить роль эукариотических организмов в мезопротерозойской биосфере. Основными препятствиями, с которыми приходит-

<sup>1</sup> Палеонтологический институт им. А. А. Борисяка РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Технологический университет Суинберна, Хоторн, Австралия

<sup>3</sup> Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А. А. Трофимука СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Университет Тюбингена, Тюбинген, Германия

\*e-mail: pinmuse@gmail.com

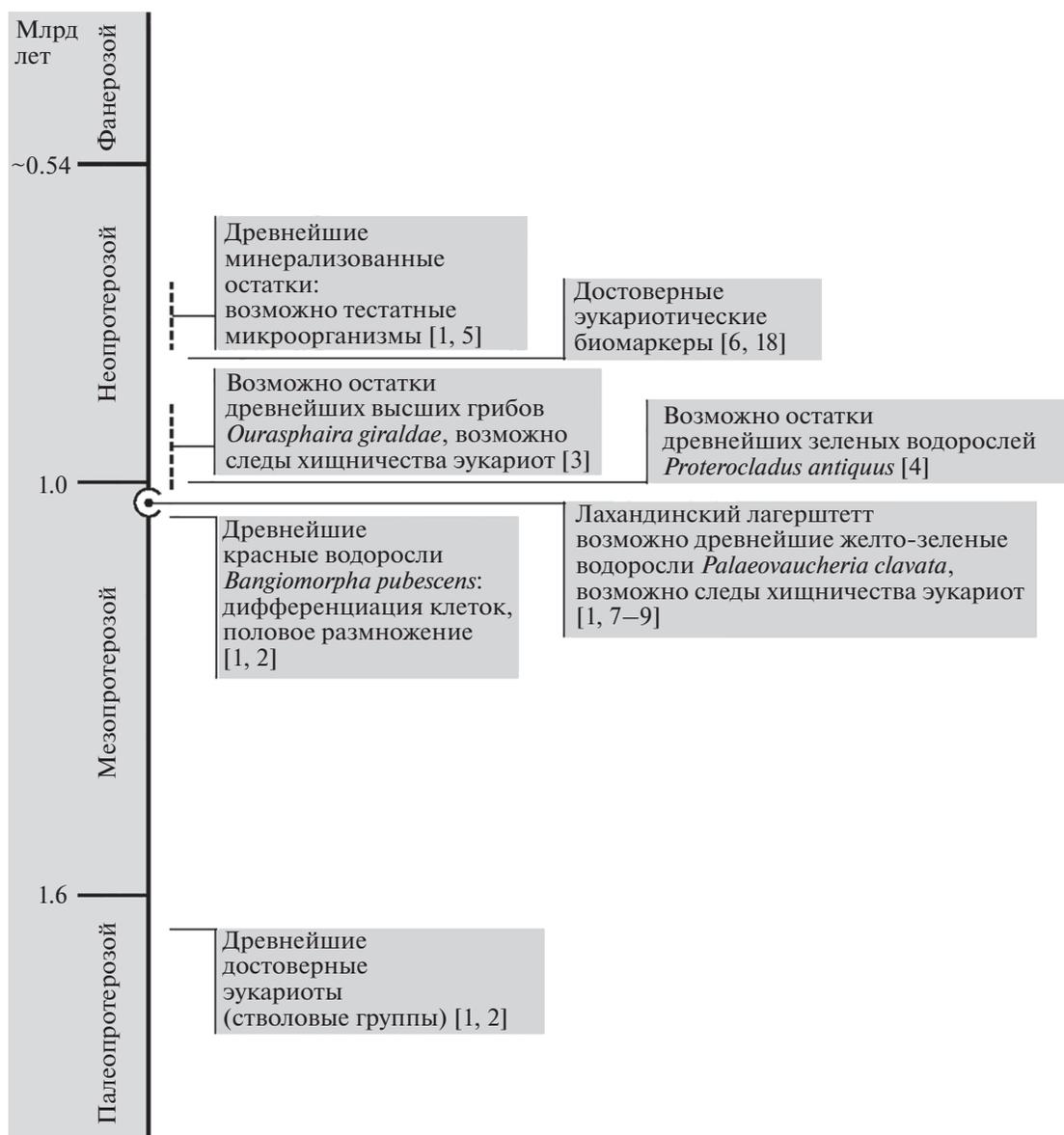


Рис. 1. Основные события в эволюции эукариот.

ся сталкиваться на пути решения этих вопросов, являются ограниченное число находок, сравнительно простая морфология организмов, а также плохая сохранность морфологически выраженных ископаемых остатков (эфоссилей). В современной палеонтологии при реконструкции филогенетических и палеоэкологических взаимоотношений древнейших организмов наряду с классическими морфологическими методами в качестве важного источника информации используются данные анализа хемофоссилей (биомаркеров), которые представляют собой остатки органических молекул, входивших в состав клеток живых организмов [6]. Биомаркеры образуются из всех организмов и могут существенно до-

полнять информацию о структуре и функционировании древних экосистем. Однако у данного вида исследований существуют ограничения — как и эфоссилей, биомаркеры могут подвергаться необратимым преобразованиям, таким как биodeградация и термическое разрушение в процессе захоронения, что приводит к утрате молекулярных диагностических признаков [6].

Лахандинская серия возрастом ~1030 млн лет содержит одну из самых богатых доэдиакарских биот, представленную органостенными остатками микроорганизмов, прекрасно сохранившимися в морских глинистых породах. Самое богатое ископаемыми лахандинское местонахождение располагается в среднем течении р. Май Учуро-

Майского района юго-восточной Сибири (рис. 2). За более чем полувековую историю изучения ископаемых из лаханды описаны почти четыре десятка морфологически и экологически разнообразных таксонов, из которых более половины с различной степенью достоверности отнесены к ядерным организмам [7, 8]. Некоторые из этих таксонов могут принадлежать к кроновым ветвям филогенетического дерева группы. Кроме того, анализ перфораций оболочек лахандинских эукариот выявил следы возможной избирательной эукариофагии [9]. По мнению некоторых исследователей, хищничество одних эукариот на других ядерных организмах было одним из главных факторов, приведших к диверсификации ранних эукариот [3]. Таким образом, лахандинская биота исключительно важна для понимания эволюции древнейших организмов.

Ниже обсуждаются находки лахандинских эуфоссилий, наиболее значимые с точки зрения диагностических признаков, позволяющих относить эти формы к домену эукариот. Также приводится краткая информация по биогеохимии вмещающих пород лахандинской серии (детальные результаты этих исследований публикуются отдельно).

### МОРФОЛОГИЯ ЭУКАРИОТ ЛАХАНДИНСКОЙ БИОТЫ

В настоящее время не существует единого подхода в определении эукариот из отложений протерозоя, хотя определенные успехи в разработке различных методик уже достигнуты. Наиболее надежной из них считается выявление диагностических признаков — синапоморфий, позволяющих относить ископаемые формы к кроновым ветвям филогенетического дерева путем сравнения морфологии эуфоссилий с морфологией современных организмов [1, 10]. Такой подход применим к относительно сложно устроенным крупным формам.

В составе лахандинской биоты следует выделить таксоны, традиционно признаваемые эукариотическими в связи с их характерной морфологией: *Palaeovaucheria clavata* Hermann, 1981, *Aimonema ramosa* Hermann et Podkovyrov, 2010, *Valeria lophostriata* (Jankauskas, 1979) Jankauskas, 1982, *Trachyhystrichosphaera aimika* Hermann, 1976, *Caudosphaera expansa* Hermann et Timofeev, 1989, *Germinosphaera bispinosa* Mikhailova, 1986, и *Jacutianema solubila* Timofeev et Hermann, 1979, [7, 8], краткий анализ морфологии которых будет приведен ниже.

Сочетание признаков *P. clavata*, включающее редкое ветвление таллома (диаметр 18–50 мкм), нерегулярно расположенные поперечные септы (в основном приуроченные к булавовидно за-

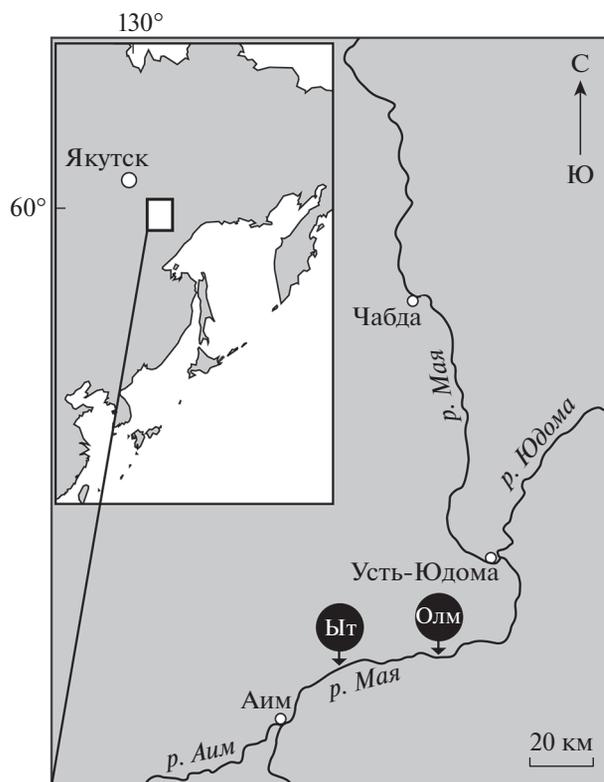
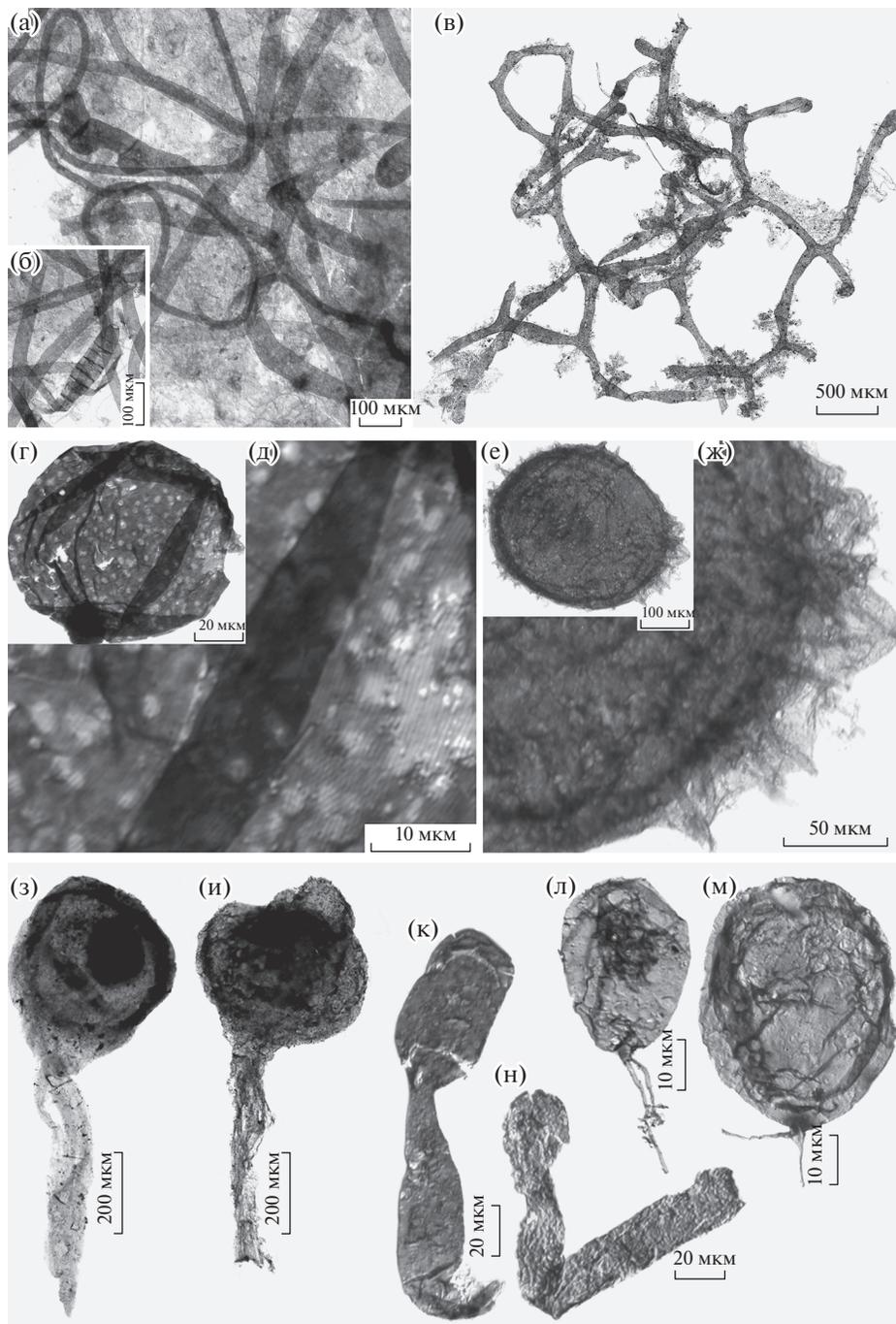


Рис. 2. Расположение изученных разрезов: Ыт — разрез Ытырында, GPS-координаты (WGS84) 58.907510 с.ш., 134.518742 в.д.; Олм — разрез Олемекен; GPS-координаты (WGS84) 58.931815 с.ш., 134.958032 в.д.

круглым окончаниям нитей), круглые отверстия, встречающиеся на концах булавовидных окончаний и расположенные вдоль оси боковые вздутия, характеризует вегетативную фазу современных желто-зеленых водорослей рода *Vaucheria* (Stramenopila) (рис. 3а, 3б). По аналогии с вошерией, булавовидные окончания у *Palaeovaucheria*, отделенные от основной нити септой, интерпретировались как зооспорангии, терминальные отверстия — как структуры, через которые высвобождались зооспоры, а боковые вздутия, разделенные септой, — как органы полового размножения — антеридии и оогонии [7]. Таким образом, *P. clavata* оказалась самым древним представителем автотрофных страменопил.

В то же время отсутствие полного экземпляра палеовошерии оставляет пространство для спекуляций. Например, сетчатый таллом *A. ramosa*, образованный анастомозирующими нитями, принимается некоторыми исследователями за более полную форму сохранности *P. clavata* [1]. Действительно, некоторые морфологические признаки аймонемы отмечаются и у палеовошерии. Это относится к ветвящемуся таллосу и нерегулярной ширине нитей (30–50 мкм), иногда имеющих булавовидные очертания (рис. 3в). Однако



**Рис. 3.** Эукариоты лахандинской биоты: а, б – нитчатые ценоцитные остатки *Palaeovaucheria clavata*: а – экз. ИГГД РАН, № 28/4, боковые вздутия, разделенные септой (предполагаемые антеридий и оогоний) на редко ветвящемся талломе, б – экз. ИГГД РАН, № 27/25, круглое отверстие на конце утолщенного окончания нити (предполагаемый зооспорангий), в – сетчатый анастомозный бесклеточный таллом *Aimonema ramosa*, голотип ИГГД РАН, № 7/5-III.08; г, д – орнаментированные *Valeria lophospriata*, экз. ЦКП “Геохрон” ИНГГ СО РАН, № 396-14: г – общий вид, д – увеличенный участок оболочки со стрiated структурой; е, ж – акантоморфные *Trachyhystrichosphaera aimika*, экз. ЦКП “Геохрон” ИНГГ СО РАН, № МН-8-2-1: е – общий вид, ж – увеличенный участок оболочки с выростами; з, и – спорангиеподобные эукариоты *Caudosphaera expansa* Hermann et Timofeev, 1989: з – голотип ИГГД РАН, № 26/7-IV.69, и – экз. ПИН РАН, № 5805/3001; к, л – неописанная форма: к – экз. ЦКП “Геохрон” ИНГГ СО РАН, № 395-9, л – экз. ЦКП “Геохрон” ИНГГ СО РАН, № 395-10; м, н – формы, напоминающие прорастающие споры эукариот *Jacutianema solubila*: м – экз. ПИН РАН, № 5805/3002, н – экз. ПИН РАН, № 5805/3003; юго-восточная Сибирь, Учуро-Майский район, р. Мая, лахандинская серия: кумахинская свита, разрез Ытырында (а–и, м, н), нельканская свита, разрез Олемекен (к, л).

таллому аймонемы свойственно анастомозное ветвление, не известное у желто-зеленых водорослей, но встречающееся у филогенетически удаленной группы хищных нематофаговых грибов [8]. Кроме того, в отличие от палеовошерии, таллом аймонемы полностью лишен перегородок, а на окончаниях нитей таллома не встречаются отверстия. Учитывая перечисленные различия, отождествление этих ископаемых таксонов представляется необоснованным. Но подчеркнем, что эукариотная природа палеовошерии и аймонемы сомнений не вызывает, поскольку хотя среди прокариот и встречаются формы, образующие ценочитный ветвящийся мицелий, диаметр их нитей не превышает двух микрометров [11].

Пример палеовошерии относится к разряду редчайших. Большинство же протерозойских ископаемых остатков лишены диагностических признаков, позволяющих ассоциировать их с конкретными современными организмами. Это может быть связано либо с первичным отсутствием у них каких-либо синапоморфий, либо с их утратой в процессе фоссилизации. Поэтому для подавляющего большинства протерозойских эуфоссилий возможна интерпретация лишь до домена. Для этого достаточно выявить определенные конструктивные детали морфологии или их комбинации, возможные только при эффективной локализации основных внутриклеточных процессов (компарментализация внутриклеточного пространства), свойственной эукариотам и не встречающейся у прокариот. К таким деталям строения, например, можно отнести характер орнаментации клеточной стенки и наличие выростов, которые в сочетании с крупными размерами данных элементов не встречаются у прокариот.

Так, к эукариотам следует относить лахандинских стриадных акритарх *Valeria lophostriata*, акантоморфных акритарх *Trachyhystrichosphaera aimika*, спорангиоподобные структуры *Caudosphaera expansa* и новую еще не описанную форму, а также сферические и цилиндрические оболочки с единичными отростками ценочитного уровня организации, напоминающие прорастающие споры низших грибов, страменопил и зеленых водорослей — *Germinosphaera bispinosa* и *Jacutianema solubila*.

Концентрически ребристые сферические оболочки *V. lophostriata* диаметром более 60 мкм относятся к эукариотам на основании крупных размеров элементов скульптуры — ребра имеют ширину около 1 мкм (рис. 3г, 3д), в то время как у прокариот аналогичные структуры не выходят из нанометрового класса. Значительно более крупные оболочки *T. aimika* (диаметр > 200 мкм) покрыты полыми нерегулярно расположенными выростами диаметром ~5 мкм и длиной более 40 мкм (рис. 3е, 3ж). Несмотря на то что среди бактерий, живущих в насыщенных питательными веще-

ствами условиях, встречаются клетки сравнимого размера, они не орнаментированы, как и макроскопические колониальные оболочки цианобактериальных водорослей. Следует отметить, что некоторые спорангиоподобные структуры бактерий могут быть снабжены выростами, но их диаметр не выходит из нанометрового диапазона [10]. Большая часть акритарх обычно относится к одноклеточным протистам, по-видимому, растительного происхождения, хотя встречаются формы, демонстрирующие морфологию, характерную для зооспоровых грибов. К сожалению, за недостатком диагностических признаков, определение их систематического положения внутри домена эукариот в значительной мере спекулятивно.

Отдельную группу в лахандинской биоте образуют гладкие сферические оболочки с одиночным отростком. Среди этих форм выделяются *C. expansa* — это сферы диаметром более 200 мкм, снабженные хвостобразным отростком, состоящим из более тонких нитей около 1 мкм толщиной (рис. 3з, 3и), и еще не описанная форма, представленная субсферическими оболочками диаметром более 30 мкм, прикрепленными через короткую ножку к нитям диаметром около 1 мкм (рис. 3к, 3л). Морфология этих ископаемых форм близка к виду *Ourasphaira giraldae* Loron et al., 2019 из (?) мезо- и неопротерозойских отложений Арктической Канады. В составе стенки оболочки *O. giraldae* присутствует хитин и отсутствует целлюлоза, что, учитывая внешний облик и относительно регулярное септирование таллома, является диагностическим признаком грибов [3]. На данный момент у нас пока нет данных о биохимии новой лахандинской фоссилии, что затрудняет систематическую интерпретацию этих ископаемых остатков. Сходной морфологией обладает *G. bispinosa* — это сферические оболочки диаметром 30–40 мкм, несущие постепенно сужающийся к свободному концу вырост, полость которого свободно сообщается с полостью сферы.

Кроме того, к морфогруппе гладких сфер с одиночным отростком могут быть отнесены представители вида *J. solubila* — сферические до цилиндрических оболочки 20–40 мкм в диаметре с одиночным, выдержанным по ширине трубчатым выростом, имеющим единую со сферой полость (рис. 3м, 3н). Хотя среди бактерий известны формы, споры которых при прорастании образуют длинные выросты, они значительно меньшего размера [10]. Также некоторые бактерии способны образовывать сложные ветвящиеся структуры со стеблями, увенчанными сферическими спорангиоподобными плодовыми телами до 1000 мкм [12]. Однако поверхность крупных плодовых тел не гладкая, а бугристая, повторяющая форму входящих внутри спор [13].

Таким образом, несмотря на относительную простоту морфологии обсуждаемых фоссилий, их наиболее вероятные аналоги следует искать среди эукариот. Морфологию, близкую к таковой у *C. expansa*, *G. bispinosa* и новой неописанной формы, можно наблюдать у низших грибов, страменопил и зеленых водорослей [7, 14–16].

### БИОГЕОХИМИЯ ПОРОД ЛАХАНДИНСКОЙ СЕРИИ

Как было продемонстрировано выше, породы лахандинской группы содержат комплекс достоверных эукариот. Возникает вопрос, сохранились ли в этих породах молекулярные следы ядерных организмов, учитывая, что породы палео- и мезопротерозоя, как правило, обеднены биомаркерами, специфичными для этого домена, а именно регулярными стеранами [6]. Об отсутствии стеранов из единственного исследованного образца глинистых пород лахандинской серии ранее сообщалось в статье М.М. Павловской и соавт. [17]. К сожалению, в упомянутой работе не рассмотрены такие вопросы, как термическая зрелость и сингенетичность углеводородов. В то же время верификация этих данных крайне желательна при исследованиях биомаркеров древних пород для обеспечения надежности результатов [6]. Для восполнения этого пробела мы проводим исследование по оценке сохранности органического вещества в 13 образцах лахандинских аргиллитов. Предварительные результаты анализа состава аутигенных биомаркеров в битумах и керогеновых фракциях из аргиллитов кумахинской и нельканской свит лахандинской серии, собранных нами в ходе полевых работ 2017–2019 гг., демонстрируют незначительное присутствие следов гопанов и полное отсутствие стеранов. Такой результат может подтверждать идею о подчиненной роли эукариот в функционировании морских экосистем мезопротерозоя [1, 6, 17, 18]. Однако анализ термической зрелости органического вещества демонстрирует, что оно было подвергнуто значительному термическому стрессу в зоне катагенеза. Термические преобразования привели к утрате углеводородами диагностических признаков, необходимых для выявления эндемичных биомаркеров.

Таким образом, наиболее надежным методом в определении систематического состава древнейших микроорганизмов из протерозойских отложений остается сравнительно-морфологический подход. Это особенно актуально для отложений, подвергшихся термическому воздействию, при анализе которых использование биогеохимических методов оказывается ограниченным.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Руководствуясь современными критериями определения эукариот в ископаемой летописи, в лахандинской биоте можно выделить несколько групп достоверно эукариотических организмов, к которым относятся описанные ранее орнаментированные акритархи (*V. lophostriata*, *T. aimika*), ценцитные или сифоновые нитчатые (*P. clavata* и *A. ramosa*), а также гладкие сферические оболочки с единичным отростком (*C. expansa*, *J. solubila* и *G. bispinosa*). Кроме этого, наше исследование выявило ранее неописанную спорангиоподобную ископаемую форму, также отнесенную к эукариотам. Эукариотическая природа вышеперечисленных ископаемых форм не вызывает сомнений в связи с крупными размерами остатков и отдельными морфологическими элементами, не встречающимися у прокариот. Однако геохимическое исследование органического вещества вмещающих пород лахандинской серии не выявило в них биомаркеров, характерных для эукариот (регулярных стеранов). В сочетании с палеонтологическими данными это может указывать на незначительный вклад эукариот в функционировании лахандинской биоты. Также проведенное исследование показывает, что наиболее надежным методом в определении систематического состава древнейших микроорганизмов из большинства протерозойских отложений остается сравнительно-морфологический анализ.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ, грант № 17-54-12077\_ННЮа) и Немецким исследовательским фондом (DFG, гранты № DU 1450/5-1, № DU 1450/4-1).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Butterfield N.J.* Early evolution of the Eukaryota // *Palaeontology*. 2015. V. 58. P. 5–17.
2. *Javaux E.J., Lepot K.* The Paleoproterozoic fossil record: Implications for the evolution of the biosphere during Earth's middle-age // *Earth-Science Reviews*. 2018. V. 176. P. 68–86.
3. *Loron C.C., François C., Rainbird R.H. et al.* Early fungi from the Proterozoic era in Arctic Canada // *Nature*. 2019. V. 570. № 7760. P. 232–235.
4. *Tang Q., Pang K., Yuan X.L., Xiao S.H.* A one-billion-year-old multicellular chlorophyte // *Nature Ecology & Evolution*. 2020. V. 4. № 4. P. 543–559.
5. *Wood R.* Exploring the drivers of early biomineralization // *Emerging Topics in Life Sciences*. 2018. V. 2. № 2. P. 201–212.
6. *Love G.D., Zumberge J.A.* Emerging patterns in Proterozoic lipid biomarker records // *Proterozoic Lipid Biomarker Records*. Cambridge: Cambridge University Press, 2021. P. 1–95.

7. Янкаускас Т.В., Михайлова Н.С., Герман Т.Н. и др. Микрофоссилии докембрия СССР. Ленинград: Наука, 1989. 191 с.
8. Герман Т.Н., Подковыров В.Н. Находки рифейских гетеротрофов в лахандинской серии Сибири // Палеонтологический журнал. 2010. № 4. С. 15–23.
9. Шувалова Ю.В., Наговицин К.Е., Пархаев П.Ю. Следы древнейших трофических взаимодействий в рифейской биоте (лахандинский лагерштетт, юго-восточная Сибирь) // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2021. V. 496. P. 34–40.
10. Javaux E.J., Knoll A.H., Walter M.R. Recognizing and interpreting the fossils of early eukaryotes // Origins of Life and Evolution of Biospheres. 2003. V. 33. № 1. P. 75–94.
11. Kämpfer P., Parkes L., van Keulen G., Dyson P. The Family *Streptomycetaceae* // The Prokaryotes: Actinobacteria. Berlin, Springer: 2014. P. 889–1010.
12. Shimkets L.J., Dworkin M., Reichenbach H. The Myxobacteria // The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass. NY: Springer, 2006. P. 31–115.
13. Grilione P.L., Pangborn J. Scanning electron microscopy of fruiting body formation by myxobacteria // Journal of Bacteriology. 1975. V. 124. № 3. P. 1558–1565.
14. Tell G. Contribución al conocimiento de las algas del suelo bonaerense. I. *Botrydium granulatum* y *B. tuberosum* // Darwiniana. 1970. V. 16. № 1/2. P. 139–143.
15. Longcore J. Morphology and zoospore ultrastructure of *Entophlyctis luteolus* sp. nov. (Chytridiales): implications for chytrid taxonomy // Mycologia. 1995. V. 87. P. 25–33.
16. An J.W., Kang P.J., Nam K.W. *Derbesia maxima* sp. nov. (Bryopsidales, Chlorophyta) from Korea based on morphological and molecular data // Journal of Applied Phycology. 2020. V. 32. № 4. P. 2689–2696.
17. Pawlowska M.M., Butterfield N.J., Brocks J.J. Lipid taphonomy in the Proterozoic and the effect of microbial mats on biomarker preservation // Geology. 2013. V. 41. № 2. P. 103–106.
18. Knoll A.H., Summons R.E., Waldbauer J.R., Zumberge J.E. The geological succession of primary producers in the oceans // Evolution of primary producers in the sea. Cambridge: Academic Press, 2007. P. 133–163.  
<https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50009-6>

## EARLY EUKARYOTES IN THE LAKHANDA BIOTA (MESOPROTEROZOIC, SOUTHEASTERN SIBERIA) – MORPHOLOGICAL AND GEOCHEMICAL EVIDENCE

J. V. Shuvalova<sup>a,b,#</sup>, K. E. Nagovitsin<sup>c,d</sup>, J.-P. Duda<sup>e</sup>, and P. Yu. Parkhaev<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Swinburne University of Technology, Hawthorn, Australia

<sup>c</sup> Trofimuk Institute of Petroleum Geology and Geophysics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>d</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>e</sup> University of Tübingen, Tübingen, Germany

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

Presented by academician of the RAS A.V. Lopatin

The Mesoproterozoic Lakhanda Group (~1030 Ma) preserves one of the most diverse communities of the pre-Ediacaran eukaryotes. Lakhanda Biota includes more than twenty taxa that have been assigned to eukaryotes with different degrees of confidence. Eight of these taxa meet current criteria for the identification of eukaryotic fossils in ancient rocks. These include previously described fossils such as ornamented acritarchs (*Valeria lophostriata*, *Trachyhystrichosphaera aimika*), filamentous coenocytic organisms (*Aimonea ramosa*, *Palaeovaucheria clavata*), as well as fossils with smooth-walled envelopes and single outgrowth structures (*Caudosphaera expansa*, *Germinosphaera bispinosa*, and *Jacutianema solubila*). In addition to these, we found as yet undescribed fossils which share remarkable similarities with the genus *Ourasphaira*, a possible higher fungi species known from the Meso- to Neoproterozoic of Arctic Canada. Regardless of the exact systematic affinity, these fossils can confidently be assigned to eukaryotes because of the size and high morphological complexity. Intriguingly, the organic record of the Lakhanda Formation lacks biomarkers indicative of eukaryotes. i.e. regular steranes. This finding favors the idea that eukaryotes were present but not significant in Mesoproterozoic marine ecosystems. However, preliminary data from an ongoing study indicate an advanced thermal maturity of the organic matter, emphasizing that this conclusion might not be drawn with absolute confidence.

**Keywords:** Lakhanda biota, eukaryotes, biomarkers, Mesoproterozoic

УДК 612.821 + 612.014.423 + 843.7

## ВНУТРИКОРКОВЫЕ НАПРАВЛЕННЫЕ СВЯЗИ ПРИ УДЕРЖАНИИ ИНФОРМАЦИИ В ЗРИТЕЛЬНО-ПРОСТРАНСТВЕННОЙ РАБОЧЕЙ ПАМЯТИ

© 2021 г. Е. С. Михайлова<sup>1,\*</sup>, А. В. Курганский<sup>2,3</sup>, Р. А. Нуштаева<sup>1</sup>,  
Н. Ю. Герасименко<sup>1</sup>, А. Б. Кушнир<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН М.А. Островским

Поступило 22.03.2021 г.

После доработки 11.05.2021 г.

Принято к публикации 11.05.2021 г.

Группа из 27 здоровых молодых взрослых испытуемых решала требующую участия рабочей памяти (РП) задачу на сравнение пространственной ориентации двух последовательно предъявляемых прямоугольных решеток. Исследовали направленные связи между фронтальными и постцентрными корковыми отделами зрительной системы, оцененные методом векторного авторегрессионного моделирования ЭЭГ. Показано, что на тета-частотах сила правополушарных нисходящих влияний фронтальной коры на зрительные области на этапе удержания стимула в РП значимо ниже, чем на этапе ожидания стимуляции; на альфа-частотах, напротив, выявлено незначительное усиление нисходящих влияний. Результаты показывают частотно-зависимую динамику нисходящих влияний фронтальной коры на зрительные области и подтверждают, что фронтальная кора является управляющим и модулирующим центром в структуре РП.

*Ключевые слова:* человек, рабочая память, ЭЭГ- ритмы, направленная когерентность, ориентационные характеристики

DOI: 10.31857/S2686738921050231

Термин “рабочая память” (РП) относится к мозговой системе временного хранения и преобразования информации, которая обеспечивается согласованной работой ансамбля взаимодействующих отделов коры и подкорковых образований [1]. Поэтому в экспериментальных исследованиях рабочей памяти придается такое значение исследованию функциональных связей между участниками ансамбля и, в особенности, оценке силы направленных связей между ними – силы эффективных связей [2]. Для решения этой задачи используют данные функциональной магнито-резонансной томографии, электрической и/или магнитной активности коры головного мозга и

широкий спектр математических методов оценки функциональных и эффективных связей.

В функциональной организации РП префронтальная кора (ПФК) является важным управляющим центром. Нисходящие влияния являются механизмом приоритетности переработки релевантной информации [3]; за счет нисходящего контроля минимизируется влияние дистракторов [4], улучшается качество репрезентаций релевантных стимулов в сенсорных областях [5]. Нисходящие влияния играют важную роль на всех этапах РП, не только при ответе на внешний сигнал (кодирование информации, сличение внутренней энграммы с текущим стимулом), но и в его отсутствие, например, при ожидании стимула [6] и удержании актуальной информации в памяти [1].

Начиная с исследования Fuster и Alexander, проведенного в 1971 г. [7], стало понятным, что период удержания информации характеризуется активацией обширной системы областей мозга, включающей префронтальную и нижнетеменную кору, височные отделы, моторную ассоциативную кору, сенсорные области, а также таламус и базальные ядра (более подробно см. обзор [8]). На этом этапе за счет нисходящих влияний поддер-

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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт возрастной физиологии Российской академии образования, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт общественных наук Российской академии народного хозяйства и государственной службы при Президенте РФ, Москва, Россия

\*e-mail: esmikhailova@mail.ru

живаются приоритеты сохраняемых в памяти стимулов [3]. При этом факторами, определяющими успешность выполнения задачи РП, являются не только точность детального описания удерживаемого стимула в низкоуровневых сенсорных областях [8], но и наличие его репрезентации в лобной коре, что важно для поддержания представления стимула на разных иерархических уровнях зрительного анализатора [9]. Таким образом, взаимодействие дистантно удаленных участков мозга на этапе удержания является одним из важных факторов производительности РП. Однако исследования в этом направлении немногочисленны и в силу использования в них разных экспериментальных моделей и способов обработки мозговой активности пока не дают четкого представления об организации нисходящего контроля на этапе удержания информации, т.е. в ситуации, когда сам стимул отсутствует в поле зрения человека.

В настоящей работе экспериментально исследовали характер эффективных связей между ПФК и постцентральной корковыми отделами зрительной системы при выполнении задачи рабочей памяти на ориентации двумерных пространственных решеток различного пространственного периода на интервале, предшествующем кодированию информации и при ее удержании. Оба эти интервала функционально эквивалентны в отношении уровня избирательного внимания, но различаются тем, что второй интервал является периодом активного удержания информации об эталонном стимуле для его последующего сравнения с тестовым. Мы предполагали, что сопоставление силы эффективных связей на этих двух этапах позволит выявить те внутрикорковые связи, которые характерны для периода удержанием информации, т.е. связанные непосредственно с механизмами РП.

В исследовании участвовали 27 испытуемых (13 мужчин и 14 женщин,  $22.57 \pm 0.46$  года) с нормальным зрением. От всех испытуемых получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен этической комиссией ИВНД и НФ РАН, протокол № 1 от 15. 01. 2020 г. Стимулы – черно-белые высококонтрастные прямоугольные двумерные ориентационные решетки с наклоном линий 0 (горизонталь), 90 (вертикаль) и 45 град. Размер стимула на экране – 5.5 угловых градусов, освещенность на уровне глаз испытуемого – 3 лк. Испытуемого просили определить, совпадают ли ориентации линий этих двух стимулов, и нажать на соответствующую кнопку клавиатуры. Длительность стимулов – 100 мс; время межстимульного интервала изменялось в случайном порядке от 1500 до 1700 мс. Интервал между отдельными последовательностями – 3000 мс. Стимулы и временные характеристики одной последовательности стимулов представлены на

рис. 1. В эксперименте испытуемому предъявляли 90 пар совпадающих (по 30 для каждой ориентации) и 180 пар несовпадающих ориентаций (по 60 для каждой ориентации), всего 270 пар стимулов. У испытуемых регистрировали ЭЭГ в процессе решения ими задачи на сравнение ориентации удерживаемой в РП эталонной решетки с ориентацией последующей тестовой. ЭЭГ регистрировали на 128-канальном энцефалографе (Electrical Geodesics Inc., USA) при стандартных параметрах регистрации, рекомендованных производителем.

Для оценки силы эффективных связей применялся метод векторного авторегрессионного моделирования (VAR–моделирование) [10]. VAR-модель предполагает, что для произвольного дискретного момента времени  $n$  вектор–столбец текущих значений сигнала  $x(n)$  складывается из линейной комбинации предыдущих его значений  $x(n-p)$  вплоть до значения, которое наблюдалось  $P$  отсчетов назад ( $P$  называется порядком VAR–модели), и текущего вектора белого гауссовского шума  $e(n)$ :

$$x(n) = \sum_{p=1}^{p=P} a(p)x(n-p) + e(n).$$

Здесь  $a(p)$  – квадратная матрица размерностью  $128 \times 128$ , элементы которой  $a_{km}(p)$  показывают, какой вклад в текущее значение сигнала  $x_k(n)$  в канале  $k$  вносит сигнал  $x_m(n-p)$  в канале  $m$ .

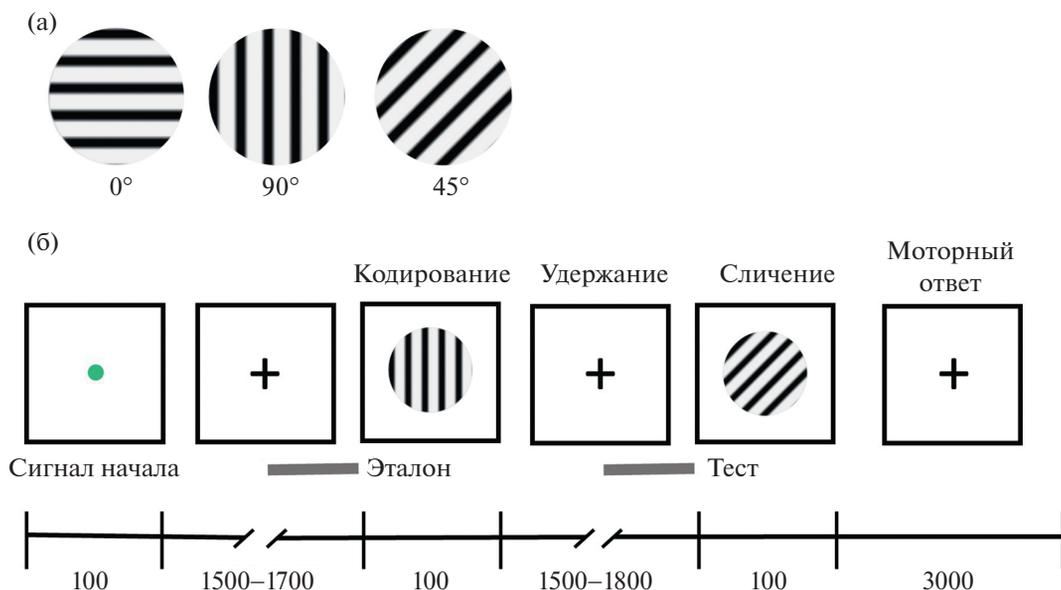
В частотной области на основе коэффициентов  $a_{km}(p)$  вычисляют функцию направленной когерентности  $DC$  [11]:

$$DC_{km}(f) = \frac{\sigma_{mm}H_{km}(f)}{\sqrt{S_{kk}(f)}}.$$

Здесь  $f$  обозначает частоту,  $\sigma_{mm}$  – стандартное отклонение белого шума  $e_m(n)$ ,  $H_{km}(f)$  – элемент системной матрицы [11], а  $S_{kk}(f)$  – спектр мощности сигнала в канале  $k$ .

Направленная когерентность характеризует силу эффективной связи, т.е. степень направленного влияния одного канала на другой, и показывает, какую долю в спектр мощности сигнала в канале  $k$  вносит сигнал, порожденный в канале  $m$ .

Значения  $DC_{km}(f)$  усреднялись по частоте в частотных диапазонах тета (4–8 Гц) и альфа (8–13 Гц), а затем анализировались с помощью дисперсионного анализа по схеме с повторными измерениями (RM ANOVA). Внутрииндивидуальными факторами были Полушарие (левое, правое), Частотный диапазон (тета, альфа), Условие (900 мс перед эталонным стимулом и 900 мс перед тестовым), Направление связи (нисходящее и восходящее) и Пара сенсоров (три пары). С учетом ранее полученных нами данных [12] были выбраны три



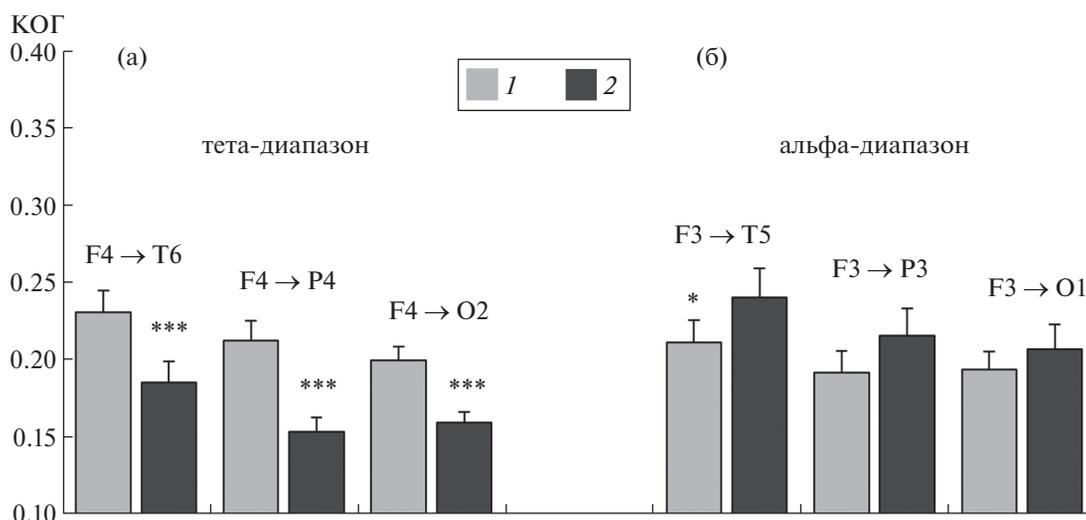
**Рис. 1.** Условия эксперимента. а – ориентационные решетки горизонтальной, вертикальной и наклонной ориентаций. б – временная последовательность событий в одном блоке эксперимента. Серым отмечены 900 мс интервалы, на которых рассчитывали направленную когерентность.

пары сенсоров, каждая из которых позволяла оценить связь между ЭЭГ под фронтальным электродом (F3/F4) и сенсорами над теменной (P3/P4), височной (T5/T6) и затылочной (O1/O2) областями коры.

Для понимания специфики организации эффективных связей в РП наиболее важными были данные по основному эффекту фактора *Условие* и всех включающих этот фактор взаимодействий. Дисперсионный анализ значений направленной когерентности обнаружил значимый основной эффект фактора *Условие* [ $F(1, 25) = 5.068$ ;  $p = 0.033$ ;  $\eta^2 = .169$ ], а также ряд взаимодействий, включающих этот фактор. Значимыми оказались три двойных взаимодействия: *Полушарие*  $\times$  *Условие* [ $F(1, 25) = 8.004$ ;  $p = 0.009$ ;  $\eta^2 = 0.243$ ], *Диапазон*  $\times$  *Условие* [ $F(1, 25) = 4.878$ ;  $p = 0.037$ ;  $\eta^2 = 0.163$ ] и *Направление*  $\times$  *Условие* [ $F(1, 25) = 9.888$ ;  $p = 0.004$ ;  $\eta^2 = 0.283$ ] и два тройных взаимодействия: *Полушарие*  $\times$  *Диапазон*  $\times$  *Условие* [ $F(1, 25) = 14.302$ ;  $p = 0.001$ ;  $\eta^2 = 0.364$ ] и *Диапазон*  $\times$  *Условие*  $\times$  *Направление* [ $F(1, 25) = 12.341$ ;  $p = 0.002$ ;  $\eta^2 = 0.330$ ]. С учетом значимых взаимодействий фактора *Условие* с факторами *Полушарие* и *Диапазон* далее мы провели дисперсионный анализ направленной когерентности отдельно для каждого полушария и каждого ритма. Для тета-диапазона частот в правом полушарии обнаружены значимый главный эффект *Условия* [ $F(1.26) = 15.374$ ;  $p = 0.001$ ;  $\eta^2 = 0.372$ ] и взаимодействие *Условие*  $\times$  *Направление* [ $F(1.26) = 18.114$ ;  $p = 0.0002$ ;  $\eta^2 = 0.411$ ]. Попарные сравнения силы направленных связей между сенсора-

ми F4, с одной стороны, и P4, T6 и O2 – с другой, показали, что *Условие* влияет только на нисходящие связи F4→P4 [ $t(26) = 4.492$ ;  $p = 0.0001$ ], F4→T6 [ $t(26) = 4.060$ ;  $p = 0.0004$ ] и F4→O2 [ $t(26) = 3.758$ ;  $p = 0.001$ ]. Рисунок 2а демонстрирует этот результат. Видно, что удержание информации в зрительной РП (900 мс период перед тестовым стимулом) сопровождается значимым снижением силы нисходящих связей относительно периода перед эталонным стимулом. Для альфа-диапазона частот в левом полушарии обнаружен значимый основной эффект *Условия* [ $F(1,25) = 4.882$ ;  $p = 0.037$ ;  $\eta^2 = 0.163$ ]. Попарные сравнения силы направленных связей между сенсорами F3, с одной стороны, и P3, T5 и O1 – с другой, показали, что *Условие* влияет только на нисходящие связи. Рисунок 2б демонстрирует этот результат. Видно, что удержание информации в зрительной РП сопровождается в левом полушарии усилением нисходящих связей в альфа-диапазоне относительно периода перед эталонным стимулом. Различия статистически значимы для пары F3→T5 [ $t(25) = 2.676$ ;  $p = 0.013$ ].

В современной литературе межрегионарную синхронизацию на частотах тета-ритма связывают с центральными механизмами управления процессами РП. Согласно литературе на частотах тета-ритма осуществляется координация когнитивных операций на разных уровнях РП [13–15]. В нашем исследовании мы сравнивали функцию направленной когерентности в двух ситуациях – при направленном внимании перед значимым стимулом, и в ситуации удержания в памяти его



**Рис. 2.** Средние значения функции направленной когерентности для различных пар сенсоров в двух условиях — при ожидании стимула и при его удержании в памяти. а — значения когерентности для нисходящих связей в тета-диапазоне в правом полушарии. б — значения когерентности для нисходящих связей в альфа-диапазоне в левом полушарии. По горизонтали — пары сенсоров; по вертикали — значения функции направленной когерентности (КОГ). Светлые столбики (1) — этап ожидания стимула; темные столбики (2) — этап удержания стимула в памяти. Приведены средние по группе значения и ошибки среднего. Парные различия КОГ между двумя условиями значимы при \*\*\* —  $p < 0.001$  и \* —  $p < 0.05$ .

детального описания. Период, предшествующий поступлению значимой информации, не является периодом пассивного ожидания. В это время за счет инструкции и сигнала начала новой последовательности происходит преднастройка нейронных популяций, которая подготавливает проекционные области коры к эффективному кодированию информации, повышая его качество и тем самым эффективность РП [16]. Эти изменения в параметрах сенсорной обработки зависят от взаимодействия с сетью «контролирующих» регионов, включающих ПФК и теменную область [13].

Поэтому наблюдаемый нами более высокий уровень нисходящих влияний в период перед кодированием информации по сравнению с периодом удержания информации может быть связан с необходимостью селективной настройки нейронных популяций постцентральных зрительных областей, что важно для оптимизации этой операции и, таким образом, повышения эффективности РП. Еще одним фактором, который мог вызвать эффект уменьшения нисходящих влияний в период удержания информации относительно периода перед ее кодированием, является характер использованных в работе стимулов. Известно, что для ориентаций, как одного из базовых зрительных признаков, в эволюции сформировался особый механизм низкоуровневой перцептивной памяти, локализованной на уровне ранних зрительных областей, который на этапе удержания может быть достаточным для высокоточного сохранения информации [17]. По мне-

нию Sauseng и соавт. [18], исполнение заученного действия требует меньшего участия центрального исполнительного звена РП и характеризуется более низким уровнем межрегиональных связей.

Обнаруженные нами различия в направленной когерентности на альфа-частотах между ситуациями направленного внимания и удержания не столь выражены, как различия в тета-диапазоне, но важно подчеркнуть, что они имеют иную направленность. Значения КОГ при удержании выше, чем на этапе, предвещающем кодирование стимула. Такой результат соответствует представленным в литературе сведениям о том, что переход от этапа кодирования к этапу удержания информации сопровождается увеличением мощности альфа-колебаний и усилением альфа-синхронизации между затылочной и лобно-височной областями [15, 19]. Предполагается, что альфа-фазовая синхронизация между лобно-височной и затылочной областями мозга представляет собой функциональную сеть, которая помогает подавлять как внутренние, так и внешние отвлекающие факторы. Большая выраженность изменений альфа-когерентности слева может быть связана с тем, что ориентации являются локальными характеристиками объектов и сцен, которые анализируются преимущественно в левом полушарии [20].

Полученная нами картина изменений эффективности связей ПФК с постцентральными зрительными областями коры продемонстрировала частотно-зависимую динамику нисходящих влияний. При этом более отчетливые изменения на-

правленной когерентности в тета-диапазоне соответствуют классическим представлениям о преимущественном вовлечении в зрительно-пространственную РП структур правого полушария и особой роли колебаний тета-диапазона в нисходящих управляющих влияниях ПФК [21]. Тот факт, что динамика нисходящих влияний ПФК на постцентральные области коры надежно выявляется с помощью функции направленной когерентности, измеренной на достаточно продолжительном отрезке времени в 0.9 с, свидетельствует в пользу тонического характера такого модулирующего влияния, что хорошо согласуется со свойствами нисходящих модулирующих влияний [9]. Поэтому полученные нами данные о динамическом характере нисходящих связей — об их изменении на функционально разных этапах решения задачи — подтверждают представление о том, что в структуре рабочей памяти ПФК играет роль управляющего модулирующего центра.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана грантом РФФИ (№ 19-013-00918/19) и средствами государственного бюджета по государственному заданию Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 гг. Электрофизиологические исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием для функционального картирования мозга на базе ИВНД и НФ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller E.K., Lundqvist M., Bastos A.M. Working memory 2.0 // *Neuron*. 2018. V. 100. № 2. P. 463–475.
2. Friston K.J. Functional and effective connectivity: a review // *Brain Connectivity*. 2011. V. 1. № 1. P. 13–36.
3. Gazzaley A., Nobre A.C. Top-down modulation: Bridging selective attention and working memory // *Trends Cogn Sci*. 2012. V. 16. № 2. P. 129.
4. Cosman J.D., Lowe K.A., Zinke W., et al. Prefrontal control of visual distraction // *Current Biology: CB*. 2018. V. 28. № 3. P. 414–420.e3.
5. Squire R.F., Noudoost B., Schafer R.J., et al. Prefrontal contributions to visual selective attention // *Annual Review of Neuroscience*. 2013. V. 36. P. 451–466.
6. Talalay I., Kurgansky A., Machinskaya R. Alpha-band functional connectivity during cued versus implicit modality-specific anticipatory attention: EEG-source coherence analysis // *Psychophysiology*. 2018. V. 55. P. e13269.
7. Fuster J.M., Alexander G.E. Neuron Activity Related to Short-Term Memory September // *Science*. 1971. V. 173. № 3997. P. 652.
8. Sreenivasan K.K., D'Esposito M. The what, where and how of delay activity // *Nature Reviews. Neuroscience*. 2019. V. 20. № 8. P. 466–481.
9. Constantinidis C., Funahashi S., Lee D., et al. Persistent spiking activity underlies working memory // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2018. V. 38. № 32. P. 7020–7028.
10. Курганский А.В. Некоторые вопросы исследования кортико-кортикальных функциональных связей с помощью векторной авторегрессионной модели многоканальной ЭЭГ // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2010. Т. 60. № 6. С. 740.
11. Baccala L., Sameshima K., Ballester G., et al. Studying the interaction between brain structures via directed coherence and granger causality // *Applied Signal Processing*. 1998. V. 5. P. 40–48.
12. Михайлова Е.С., Герасименко Н.Ю., Славуцкая А.В. Сенсорные механизмы ранней дискриминации ориентаций в модели зрительной рабочей памяти // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2019. Т. 69. № 5. С. 578.
13. Gazzaley A., D'Esposito M. Unifying the prefrontal cortex: executive control, neural networks and top-down modulation. In: *The Human Frontal Lobes*. 2nd ed. New York: Guilford Publications; 2006. P. 1–40.
14. Sauseng P., Griesmayr B., Freunberger R., et al. Control mechanisms in working memory: a possible function of EEG theta oscillations // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2010. V. 34. № 7. P. 1015–1022.
15. Wianda E., Ross B. The roles of alpha oscillation in working memory retention // *Brain and Behavior*. 2019. V. 9. № 4. P. e01263.
16. Bollinger J., Rubens M.T., Zanto T.P., et al. Expectation-driven changes in cortical functional connectivity influence working memory and long-term memory performance // *Journal of Neuroscience*. 2010. V. 30. № 43. P. 14399–14410.
17. Magnussen S. Low-level memory processes in vision // *Trends in Neurosciences*. 2000 V. 23. № 6. P. 247–251.
18. Sauseng P., Hoppe J., Klimesch W. et al. Dissociation of sustained attention from central executive functions: local activity and interregional connectivity in the theta range // *European Journal of Neuroscience*. 2007. V. 25. P. 587–593.
19. Palva S., Palva J.M. New vistas for alpha-frequency band oscillations // *Trends in Neurosciences*. 2007. V. 30. № 4. P. 150–158.
20. Fink G.R., Halligan P.W., Marshall J.C. et al. 1997. V. 120. P. 1779.
21. Berger B., Griesmayr B., Minarik T., et al. Dynamic regulation of interregional cortical communication by slow brain oscillations during working memory // *Nature Communications*. 2019. V. 10. № 1. P. 4242.

## INTRACORTICAL DIRECTIONAL CONNECTIONS FOR HOLDING INFORMATION IN VISUAL-SPATIAL WORKING MEMORY

E. S. Mikhailova<sup>a,#</sup>, A. V. Kurgansky<sup>b,c</sup>, R. A. Nushtaeva<sup>a</sup>, N. Yu. Gerasimenko<sup>a</sup>, and A. B. Kushnir<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> *Institute of Developmental Physiology of the Russian Academy of Education, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *The Russian Presidential Academy of National Economy and Public Administration, Moscow, Russian Federation*

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

Presented by academician of the RAS M.A. Ostrovsky

A group of 27 healthy young adult subjects solved a task requiring the involvement of working memory (WM) to compare the spatial orientation of two successively presented square-wave luminance gratings. We investigated the effective (directed) connections between the frontal and postcentral cortical areas related to the visual system. The connections were assessed using vector autoregressive modeling of EEG. It was shown that in theta-band the strength of the descending right-hemispheric connections directed from the frontal cortex to the visual areas is significantly lower at the stage of retention of the stimulus in WM than at the stage of waiting for stimulation. On the contrary, in the alpha-band, the connections are slightly higher. The results of the study show the frequency-dependent dynamics of the descending connections and confirm the view that the frontal cortex plays the role of a controlling and modulating center in the brain system underlying WM.

*Keywords:* human subject, working memory, EEG rhythms, directed coherence, orientation selectivity

УДК 575.857

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ СЛЕДСТВИЯ КОНФЛИКТА ПОЛОВ У ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. О. В. Семенова<sup>1,\*</sup>, член-корреспондент РАН М. Л. Бутовская<sup>1</sup>

Поступило 28.04.2021 г.

После доработки 06.05.2021 г.

Принято к публикации 11.05.2021 г.

В работе представлена обновленная математическая модель эволюционной динамики конфликта полов у человека, известная как “битва полов”, и ее прогнозируемые репродуктивные следствия. Авторы указывают на принципиальные особенности репродуктивного поведения человека, на множественные биосоциальные адаптации, а также на возросшие родительские инвестиции. В результате чего конфликт полов у нашего вида переходит на уникальный уровень, характерный для действия математических принципов игры “Дилемма заключенного”, в которой доминирует эволюционно стабильная стратегия “обмана” – обоюдного отказа от родительства, и нет места колебательной динамике в смене репродуктивных стратегий. Несмотря на фатальный прогноз такой эволюционной игры, генетический анализ исторических популяций указывает на широкое присутствие феномена кооперации полов, реализующейся через моногамную норму половых взаимоотношений, соблюдение которой по нашему предположению и обеспечивало репродуктивный успех этих обществ.

*Ключевые слова:* моногамия, теория игр, дилемма заключенного, конфликт полов, анизогамия, половые роли, демография, репродукция человека

**DOI:** 10.31857/S2686738921050267

У человека в результате рождения и воспитания совместного потомства оба родителя получают несомненный репродуктивный выигрыш. Однако в ситуации, предполагающей родительские вложения с двух сторон, между родителями почти неизбежно возникает конфликт интересов. Он связан с тем, что каждый из родителей в биологическом смысле слова выигрывает в большей степени, если его партнер проявит максимум родительского участия. Это снижает итоговую потребность в родительских инвестициях первого родителя и освобождает его от части (или всех) дальнейших инвестиций в данное потомство [1]. Родительский конфликт может быть разрешен в той или иной степени в пользу одного из полов. Во множестве таксонов мы наблюдаем различие в уровне родительского участия самцов и самок, что представляет суть и природу наблюдаемого диморфизма половых ролей в предоставлении родительской заботы.

В эволюционной биологии математические игровые модели уже несколько десятилетий при-

меняются при моделировании оптимальных репродуктивных решений каждого из полов у различных биологических видов и таксонов [2, 3]. Такая упрощенная модель игры часто строится на предположении, что в процессе размножения каждый агент (родитель) может принять два решения: либо заботиться о потомстве, либо отказаться от заботы.

Стандартное допущение эволюционной теории игр состоит в том, что взаимодействия игроков симметричны. Однако в реальности взаимодействия между игроками почти всегда асимметричны. Широко известный в зарубежной научной литературе пример имитации асимметричного конфликта – это “битва полов” Ричарда Докинза (Dawkins, 1976), где моделируются взаимодействия двух условных “популяций”: мужской и женской, чей взаимный конфликт связан с затратами на воспитание потомства. Р. Докинз представляет читателю матрицы гипотетических выплат на основе следующих расчетов: “...идеальное моногамное общество. В каждой паре мужчина и женщина получают одинаковую среднюю выплату. Они получают +15 баллов за каждого рожденного и воспитанного ребенка; они делят затраты на его воспитание (–20) баллов поровну ... Они оба платят некий штраф в (–3) балла за то, что тратят время на длительное ухаживание. Таким образом, средний выигрыш для каждого из них составляет

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Дружбы народов Институт этнологии и антропологии им. Н.Н. Миклухо-Маклая РАН, Москва, Россия

\*e-mail: m4248296@yandex.ru

**Таблица 1.** Система матричных выплат Р. Докинз (1976)

фокальный игрок – мужчина			
		Ж	
		Полигамная женщина	Избирательная женщина
М	“донжуан”	15	0
	заботливый отец	5	2

фокальный игрок – женщина			
Ж		М	
		“донжуан”	заботливый отец
Полигамная женщина		-5	5
Избирательная женщина		0	2

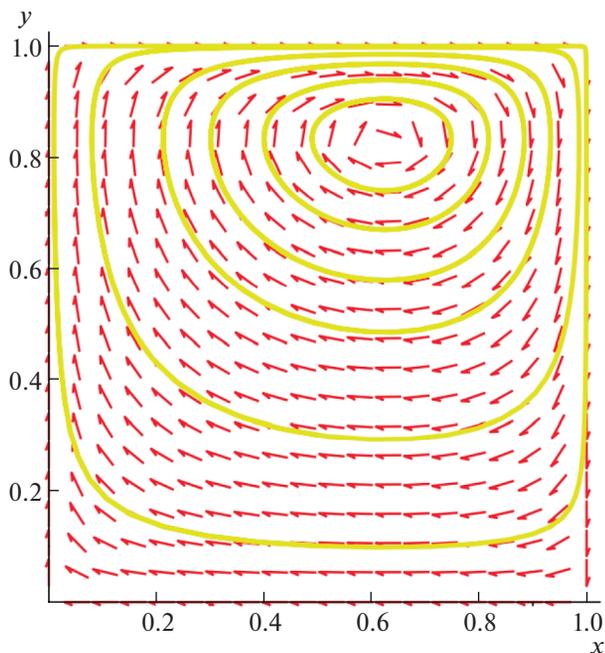
**Таблица 2.** Измененная система матричных выплат

фокальный игрок – мужчина			
М		Ж	
		Обман	Кооперация
Обман		-15 0	0 +15
Кооперация		5 -10	2

фокальный игрок – женщина			
М		Ж	
		Обман	Кооперация
Обман		-5 0	5
Кооперация		0 -5	2

+15 - 10 - 3 = +2.” [4 :151–153]. В результате полученные матрицы в терминах моногамии и полигамии для мужчин и женщин выглядят следующим образом (табл. 1; см. также Приложение 1):

Моделирование динамики данной асимметричной игры во времени может быть представлено колебательным процессом, аналогичным классическим уравнениям Лотки–Вольтерры “хищник–жертва”. Визуализация этой битвы полов, рассчитанная П. Шустером и К. Зигмундом (1981) [5] на основе предложенных Р. Докинзом матричных выплат, показана на рис. 1.



**Рис. 1.** Фазовый портрет динамических сил, отражающих “битву полов” согласно матрице выплат, предложенной Р. Докинзом, где мужчины реализуют стратегию  $X_1$  против женской игровой стратегии  $Y_1$ .

*Достоверность родства отца и ребенка – ключевой фактор в динамике конфликта полов*

Мы полагаем, что предложенная Р. Докинзом матрица выплат не учитывает важнейший фактор – фактор неопределенности отцовства в обществе с широким присутствием норм полигамных связей. Между тем с ростом женской полигамии возможные потери заботливого отца будут последовательно возрастать и негативно отражаться на условной системе матричных выплат мужчин. Принимая во внимание это обстоятельство, в нашей модели мы изменили этот параметр на отрицательное значение (-10), соответствующее половине стоимости родительских усилий по расчетам Р. Докинза (табл. 2).

Второе важное внесенное нами новшество в систему матричных выплат заключается в изменении суммы выигрыша от встречи полигамного мужчины с женщиной, не стремящейся к кооперации (к созданию семейной пары). В соответствии с нашими предсказаниями такая встреча с женщиной, не готовой к репродукции, как раз и будет иметь результирующий нулевой прирост приспособленности у обоих партнеров. Лишь встреча с готовой к материнству женщиной будет приводить к рождению ребенка, который воспитывается матерью без помощи биологического отца, если партнер окажется “обманщиком” (-5 баллов для нее и +15 для него). Мы также установим выплату для “чайлдфри” женщины, вступившей в связь с заботливым мужчиной, положительную (+5), допуская, что matrimониальные инвестиции партнера повышают ее будущий репродуктивный успех, даже в отсутствие рождений на данном этапе ее жизненного цикла (табл. 2).

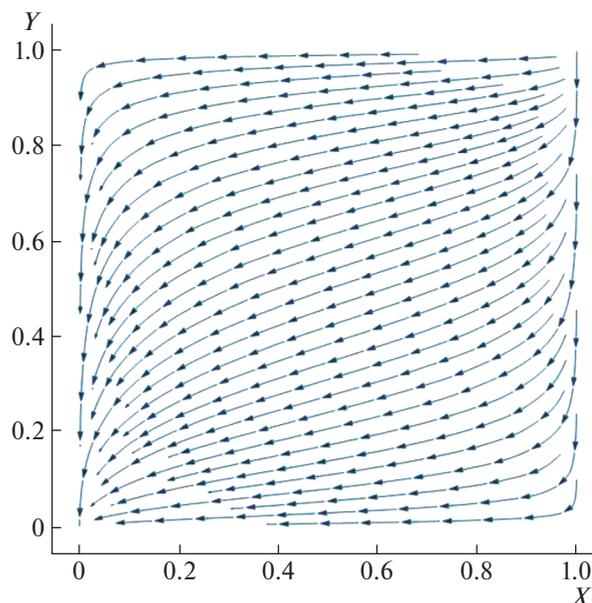
Мы рассчитали динамику полового конфликта при такой измененной форме матричных выплат (см. Приложение 2). Фазовый портрет популяционной динамики стратегий мужчин и женщин в такой популяции представлен на рис. 2.

Полученные расчеты указывают на доминирование поведенческой модели отказа от сотрудничества обоими полами в вопросе заботы о потомстве (Приложение 2). Такая игровая матрица может быть реализована на примере математической игры “Дилемма заключенного” с наличием асимметрии между полами. Игровые условия “Дилеммы заключенного” предполагают, что в популяции всегда присутствует высокая вероятность относительного проигрыша в терминах приспособленности для заботливых родителей обоих полов. Женщины, изначально ориентированные на материнство, в такой игровой модели подвержены высоким рискам остаться матерями-одиночками. Суммарные потери игроков женского пола с такой стратегией довольно велики, это определяет наличие преимуществ у их соперниц, предпочитающих стратегию отложенной репродукции, избирательности и накопления ресурсов в том числе и за счет ухаживаний партнер(а)ов. С течением эволюционного времени более выгодная стратегия отсроченной репродукции или отказа от репродукции становится доминирующей для всех женщин данной популяции. Для мужчин же в обществе с определенным пороговым значением полигамии присутствует высокий риск воспитания генетически неродного потомства. В таком обществе склонные к заботе о семье и детях мужчины из поколения в поколение будут иметь выше траты; при этом они будут оставлять меньше потомства, нежели их полигамные соперники, что в результате приведет к тому, что полигамные мужчины станут абсолютным численным большинством в популяции.

Ведя себя по отдельности рационально, на общепопуляционном уровне все вместе участники приходят к нерациональному решению: если оба партнера предадут, они получают в сумме меньший выигрыш (меньше потомства), чем если бы сотрудничали.

*Дилемма заключенного применительно к репродукции человека*

Парадоксальный на первый взгляд выбор игроков обоих полов отказа от репродукции и заботы о детях может быть связан с особенностями жизненного цикла и эволюцией нашего вида. Если забота о потомстве представляется очень длительным, высокочатным и сопряженным с риском для жизни процессом, а каждый последующий репродуктивный акт, напротив, не имеет никаких серьезных ограничений (не привязан к сезонности, не ограничен укороченным жизненным циклом, не сопряжен с серьезными сложностями или опасностью поиска и привлечения нового партнера), то в этом случае у видов с развитой бипарентальной заботой родитель раз за разом оказывается перед дилеммой: предоставить



**Рис. 2.** Фазовый портрет динамических сил “битвы полов” согласно усовершенствованной матрице выплат, где мужчины реализуют стратегию  $X_{1,2}$  (1 = заботиться или 2 = бросить потомство) против женской игровой стратегии  $Y_{1,2}$  (1 = стать матерью или 2 = отказаться от материнства)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Предполагается, что координаты любой точки  $(x; y)$  внутри фазового портрета соответствуют по абсциссе доле мужчин, реализующих стратегию заботы о потомстве, а значение на оси ординат соответствует доле женщин, реализующих стратегию материнства. Стрелками показана прогнозируемая фазовая траектория эволюционных изменений этих долей с течением времени. Согласно проведенным расчетам, эти доли стремятся к нулю.

родительскую заботу данному потомству или попытаться создать новую надежную пару с другим партнером и повторить репродуктивный цикл. В результате родитель неминуемо попадает в заданные рамки математической игры “Дилемма заключенного”. При условии распределения матричных выигрышей в данной игровой модели максимальный индивидуальный проигрыш возникает именно в случае отказа от родительства и от заботы об общем ребенке партнером, а не в случае гибели этого конкретного потомства.

Нетрудно заметить, что для человека с его особенностями жизненного цикла характерна игровая ситуация дилеммы заключенного. Действительно, ресурсные и временные затраты на воспитание каждого ребенка колоссальны. В младенчестве ребенок полностью зависим от заботы взрослого воспитателя (родителя). Предполагается, что в эволюционном прошлом большую часть времени ребенок проводил на материнских руках, буквально физически налагая ограничения на ряд ее пространственных действий и функций [6, 7]. Пролонгированный период детства представляет собой



Рис. 3. Советский плакат. Издательство МОСЗДРАВ-ОТДЕЛА, Кузнецкий мост, 6, 1925 г.

важную составляющую комплексной эволюционной перестройки жизненных циклов человека, которая сопряжена с увеличением размеров мозга, прямохождением и рождением недоразвитых с точки зрения созревания младенцев [8]. Весь долгий период детства, а также подросткового взросления, ребенок остается зависим от взрослого в ресурсных (экономических) вопросах и нуждается в длительном освоении жизненно важных навыков.

#### *Отказ женщины от репродукции в условиях эскалации конфликта полов*

Вероятность отказа от заботы о потомстве мужчинами, а также пониженный показатель уровня мужской заботы о детях в эволюционной биологии принято связывать с меньшей уверенностью отца в генетическом родстве с ребенком. Однако мы полагаем, что фиксируемые акты отказа от родительства не всегда могут на теоретическом уровне соотноситься только лишь с проблематикой достоверности родства, так как сам факт рождения ребенка женщиной является неоспоримым доказательством родства между ними, а случаи женского отказа от материнства присутствуют.

На практике отказ женщины от материнства может быть осуществлен как превентивно с использованием разнообразных техник контрацепции, так и на раннем этапе онтогенеза ребенка. В современном постиндустриальном обществе такой негативный репродуктивный ответ воплощается через пренатальное прекращение беременности — аборт. В исторических обществах антропологами были зафиксированы распространенные случаи отказа от заботы о младенце — оставление его без помощи (рис. 3), а также экс-

тремальные случаи намеренного умерщвления младенца — инфантицид [9].

#### *Базовые условия репродукции человека*

Человек разумный, *Homo sapiens*, в своем эволюционном развитии приобрел значительную независимость от действия природных сил за счет направленной трансформации окружающей его действительности. Размножение его перестало зависеть от сезонных колебаний, интервалы между родами у женщины стали укорочены в сравнении с большими человекообразными обезьянами; произошло увеличение продолжительности жизни, а возросшая социальность через совместную заботу о потомстве обеспечила определенные гарантии его выживаемости. Снижение давления средового и временного факторов, а также фактора смертности на черты жизненного цикла человека естественным образом высвободило потенциал для роста половой избирательности, которая, как известно, ведет к увеличению интервалов между репродуктивными событиями, к осознанной репродукции, или даже к осознанному отказу от нее. Теория предсказывает, что в условиях панмиксии, когда партнеры объединяются в пары случайно, независимо от стратегий, стратегия отказа от заботы будет являться наиболее рациональной как для мужчин, так и для женщин в случае эскалации конфликта полов, сопровождающегося взаимным отказом от сотрудничества [10].

Однако по данным историко-генетических реконструкций в подавляющем большинстве исследованных исторических обществ репродуктивное сотрудничество повсеместно присутствовало и предположительно реализовывалось через общественное принятие строгих моральных и нравственных брачных норм. Так, в Бельгии и Голландии генетический анализ родства ныне живущих дальних и близких родственников по отцовской линии, имеющих общие фамильные корни, иногда обнаруживаемые в прошлом на глубине до 500 лет, указывает на крайне низкий (~1–2%) процент рождений детей, зачатых вне легитимного брака, что подтверждается и данными, полученными в других преимущественно европейских популяциях [11–13]. Мы полагаем, что такая норма полового поведения определяла в этих обществах расстановку матричных выплат в конфликте полов таким образом, что это позволяло не просто закрепить плототворному репродуктивному сотрудничеству полов, но сделать моногамия довлеющей моделью взаимоотношений между мужчинами и женщинами.

Между тем в большинстве историко-генетических исследований не анализируются тупиковые линии или мертвые популяции и их уровень внебрачных зачатий, так как в указанных работах

принимают участие добровольцы – современные (выжившие) потомки успешных биологических стратегий прошлого. Учитывая присутствие широкой вариации в половых нормах, фиксируемых антропологами в современных обществах [14], исторический анализ генетического родства у вымерших фамильных линий (обществ) с привлечением археологического материала представляется многообещающим методом. Такой анализ позволит в дальнейшем сравнить на эмпирическом уровне репродуктивно успешные и тупиковые линии по критерию репродуктивного сотрудничества полов для дальнейшего обсуждения теоретических положений, изложенных авторами в данной статье.

### Приложение 1

Ричард Докинз в своей знаменитой работе “Эгоистичный ген” (первая публикация 1976 г.) так описывает цикличность “битвы полов” и определяет суммы матричных выплат для мужчин и женщин: “Теперь предположим, что одна полигамная женщин входит в моногамную популяцию... Средний балл за одного рожденного и выращенного ребенка для нее составляет  $+15 - 10 = +5$ . Она на 3 единицы успешнее, чем ее скромные соперницы. Поэтому ее полигамные гены начинают распространяться... Но теперь, если в популяции появляется мужчина-донжуан, он начинает преуспевать среди своих моногамных соперников. В популяции, где все женщины легки на подъем, добыча для мужчины-донжуана действительно богата. Он получает  $+15$  баллов, если ребенок успешно растет и развивается, и не оплачивает ни одну из двух указанных затрат. ...Каждая из его несчастных жен остается наедине с ребенком, оплачивая всю стоимость родительской платы  $-20$ , хотя она ничего и не теряет в процессе уходаживания. Чистый выигрыш для неизбирательной женщины, когда она сталкивается с мужчиной-донжуаном, равен  $+15 - 20 = -5$ ; выигрыш же для самого донжуана равен  $+15$ . Если полигамные мужчины будут столь успешны, что станут количественно доминировать среди мужской части населения, то полигамные женщины окажутся в отчаянном положении. У любой же избирательной дамы появится уверенное преимущество. Если застенчивая женщина встречается с мужчиной-донжуаном, то... ни тот, ни другой ничего не выигрывают, так как ребенок не рождается. Это приводит в итоге к нулевому результату для обеих сторон... Ноль может показаться не очень высокой платой, но это лучше, чем стандартный выигрыш для полигамной женщины минус 5 баллов.... Итак, гены женской избирательности снова начинают распространяться в популяции; это завершает гипотетический цикл, в результате которого количество избирательных женщин

увеличивается настолько, что они вновь количественно преобладают.

Теперь мужчины-донжуаны, которым было так просто с легкими на подъем партнершами, начинают чувствовать себя не у дел. Одна за другой женщины настаивают на долгом и трудном уходеживании... Чистый выигрыш для мужчины-донжуана, когда все женщины избирательны, равен нулю. Теперь, если появляется один верный отец, он единственный, с кем будут строить отношения избирательные женщины. Его чистая прибыль составляет  $+2$ , что лучше, чем результаты ловеласов. Итак, гены моногамии начинают увеличиваться в популяции, и мы проходим полный цикл”. (перевод автора, см. Dawkins, 1978:163–164).

### Приложение 2

Расчет динамики измененной “битвы полов” был проведен в соответствии с математическими расчетами, предложенными в 1981 г. П. Шустером и К. Зигмундом [5]. Измененные же нами матричные выплаты для мужчин и женщин описываются двумя обновленными матрицами:

$$\text{In}[1] := A = \begin{pmatrix} 2 & -10 \\ 15 & 0 \end{pmatrix}; \quad (1)$$

$$B = \begin{pmatrix} 2 & -5 \\ 5 & 0 \end{pmatrix}. \quad (2)$$

Таким образом, в популяции нами заданы значения выигрышей в матрицах для мужчин (A) и женщин (B), где  $a_{ij}$  соответствует выигрышу для мужчины, использующего стратегию  $X_i$  против женской игровой стратегии  $Y_j$ ; а  $b_{ij}$  – выплаты для женщины со стратегией  $Y_i$ , играющей против мужской игровой стратегии  $X_j$ .

Пусть  $x_i$  будет доля мужчин, играющих в стратегию  $X_i$ , а  $y_i$  – доля женщин, играющих в стратегию  $Y_i$ , для  $i = 1, 2$ . Очевидно, что  $x_1 + x_2 = 1$  и  $y_1 + y_2 = 1$ . Мы фокусируемся на двух переменных, скажем  $x_1$  и  $y_1$ , которые мы обозначаем через  $x$  и  $y$ .

$$\begin{aligned} \text{In}[3] := x_1 &= x; \\ x_2 &= 1 - x; \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{In}[5] := y_1 &= y; \\ y_2 &= 1 - y. \end{aligned} \quad (4)$$

Скорость увеличения доли мужчин  $\frac{dx_1(t)}{dt}$ , использующих стратегию  $X_1$  (в нашем примере эта стратегия – моногамный партнер и верный отец), составляет разницу между выигрышем для такой стратегии ( $a_{1,1} * y_1 + a_{1,2} * y_2$ ) и средним выигрышем для мужчин в популяции ( $a_{1,1} * x_1 * y_1 + a_{1,2} * x_1 * y_2 + a_{2,1} * x_2 * y_1 + a_{2,2} * x_2 * y_2$ ). Аналогичный аргу-

мент применим и к моногамным женщинам, использующим стратегию  $Y_1 \frac{dy_1(t)}{dt}$ .

$$\text{In}[7] := f[x_, y_] = x_1(A[[1,1]] * y_1 + A[[1,2]] * y_2 - (A[[1,1]] * x_1 * y_1 + A[[1,2]] * x_1 * y_2 + A[[2,1]] * x_2 * y_1 + A[[2,2]] * x_2 * y_2));$$

$$\text{In}[8] := f[x, y]$$

$$\text{Out}[8] = x(-10(1 - y) + 10x(1 - y) + 2y - 15(1 - x)y - 2xy) \quad (5)$$

$$\text{In}[9] := \text{Factor}[f[x, y]]$$

$$\text{Out}[9] = (-1 + x)x(10 + 3y) \quad (6)$$

$$\text{In}[10] := g[x_, y_] = y_1(B[[1,1]] * x_1 + B[[1,2]] * x_2 - (B[[1,1]] * x_1 * y_1 + B[[1,2]] * x_2 * y_1 + B[[2,1]] * x_1 * y_2 + B[[2,2]] * x_2 * y_2));$$

$$\text{In}[11] := g[x, y]$$

$$\text{Out}[11] = y(-5(1 - x) + 2x - 5x(1 - y) + 5(1 - x)y - 2xy) \quad (7)$$

$$\text{In}[12] := \text{Factor}[g[x, y]]$$

$$\text{Out}[12] = -(-5 + 2x)(-1 + y)y. \quad (8)$$

Для системы дифференциальных уравнений  $\frac{dx(t)}{dt} = f(x, y)$ ,  $\frac{dy(t)}{dt} = g(x, y)$  стационарные точки получаем, решая уравнения  $f(x, y) = 0$  и  $g(x, y) = 0$ .

$$\text{In}[13] := \text{Solve}[\{f[x, y] = 0, g[x, y] = 0\}, \{x, y\}]$$

$$\text{Out}[13] = \left\{ \left\{ x \rightarrow \frac{5}{2}, y \rightarrow -\frac{10}{3} \right\}, \{x \rightarrow 0, y \rightarrow 0\}, \{x \rightarrow 1, y \rightarrow 0\}, \{x \rightarrow 0, y \rightarrow 1\}, \{x \rightarrow 1, y \rightarrow 1\} \right\} \quad (9)$$

Построим матрицу Якоби в стационарной точке для анализа устойчивости:

$$\text{In}[14] := \text{JM}[x_, y_] = \left( \begin{array}{cc} D[f[x, y], x] & D[f[x, y], y] \\ D[g[x, y], x] & D[g[x, y], y] \end{array} \right) / \text{FullSimplify};$$

$$\text{In}[15] := \text{JMp} = \text{JM}\left[\frac{5}{2}, -\frac{10}{3}\right]$$

$$\text{Out}[15] = \left\{ \left\{ 0, \frac{45}{4} \right\}, \left\{ -\frac{260}{9}, 0 \right\} \right\}$$

$$\text{In}[16] := \text{MatrixForm}[\text{JMp}]$$

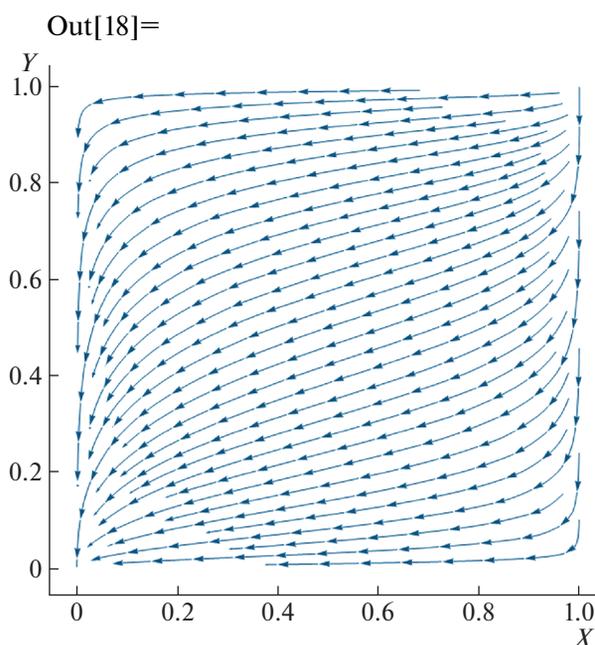
$$\text{Out}[16] // \text{MatrixForm} = \begin{pmatrix} 0 & \frac{45}{4} \\ -\frac{260}{9} & 0 \end{pmatrix} \quad (10)$$

$$\text{In}[17] := \text{Eigenvalues}[\text{JMp}]$$

$$\text{Out}[17] = \{5i\sqrt{13}, -5i\sqrt{13}\} \quad (11)$$

В силу мнимых собственных значений локальной линейной системы ее устойчивость неопределенна. Рассмотрим поле направлений.

$$\text{In}[18] := \text{StreamPlot}[\{f[x, y], g[x, y]\}, \{x, 0, 1\}, \{y, 0, 1\}]$$



Из траекторий в фазовой плоскости не удается определить тип стационарной точки. Заметим, что система  $\frac{dy(x)}{dx} = \frac{g(x, y)}{f(x, y)}$  может быть проинтегрирована.

$$\text{In}[19] := \int \frac{10 + 3y}{(-1 + y)y} dy = \int \frac{(5 - 2x)}{(-1 + x)x} dx$$

$$\text{Out}[19] = 13 \log[1 - y] - 10 \log[y] = 3 \log[1 - x] - 5 \log[x]. \quad (12)$$

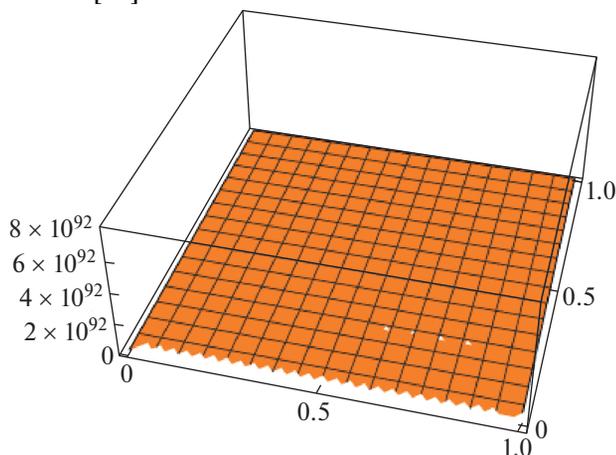
На основе полученного результата построим функцию  $V(x, y)$

$$\text{In}[20] := V[x_, y_] = (1 - y)^{13} y^{-10} (1 - x)^{-3} x^5$$

$$\text{Out}[20] = \frac{x^5(1 - y)^{13}}{(1 - x)^3 y^{10}} \quad (13)$$

$$\text{In}[21] := \text{Plot3D}[V[x, y], \{x, 0, 1\}, \{y, 0, 1\}, \text{PlotRange} \rightarrow \text{All}]$$

Out[21] =



Проверим, что производная по времени от функции  $V(x, y)$  равна нулю:

$$\begin{aligned} \text{In}[22] &:= \text{Vdot}[x\_ , y\_ ] = \\ &= D[V[x, y], x] * f[x, y] + D[V[x, y], y] * g[x, y] \end{aligned}$$

$$\text{Out}[22] = x \left( \frac{5x^4(1-y)^{13}}{(1-x)^3 y^{10}} + \frac{3x^5(1-y)^{13}}{(1-x)^4 y^{10}} \right) \times \quad (14)$$

$$\times (-10(1-y) + 10x(1-y) + 2y - 15(1-x)y - 2xy) +$$

$$+ \left( -\frac{10x^5(1-y)^{13}}{(1-x)^3 y^{11}} - \frac{13x^5(1-y)^{12}}{(1-x)^3 y^{10}} \right) \times$$

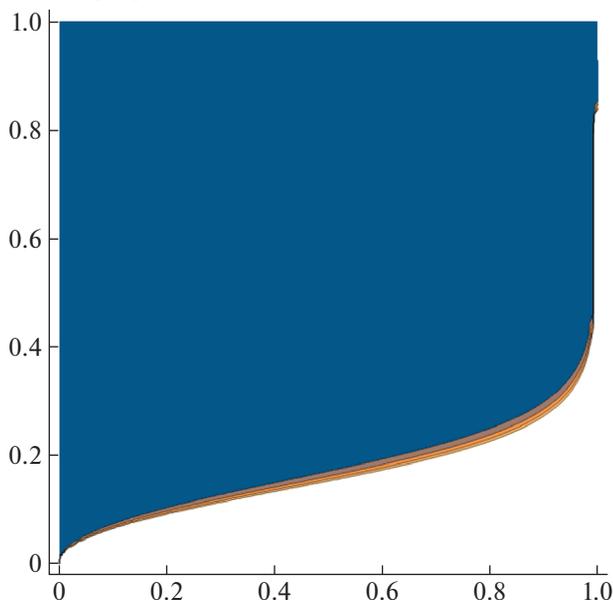
$$\times y(-5(1-x) + 2x - 5x(1-y) + 5(1-x)y - 2xy)$$

$$\text{In}[23] := \text{Simplify}[\text{Vdot}[x, y]]$$

$$\text{Out}[23] = 0 \quad (15)$$

$$\text{In}[24] := \text{ContourPlot}[V[x, y], \{x, 0, 1\}, \{y, 0, 1\}]$$

Out[24] =



## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-313-90010 (ОВС), и в соответствии с планом научно-исследовательских работ Института этнологии и антропологии РАН (МЛБ).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.Д. Пузикову за помощь в реализации представленных в статье математических вычислений в программной среде Wolfram Mathematica.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lessells K.M.* The evolutionary outcome of sexual conflict // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006. P. 301–317.
2. *Maynard J.* The “Battle of the Sexes”: A Genetic Model with Limit Cycle Behavior // 1987. V. 32. P. 1–14.
3. *Vasin A.A.* Human Reproduction and Utility Functions: An Evolutionary Approach // *Psychology, Rationality and Economic Behaviour*. 2005. P. 106–124.
4. *Dawkins R.* The Selfish Gene // Oxford University Press. 1978. P. 220.
5. *Schuster P., Sigmund K.* Coyness, philandering and stable strategies // *Animal Behaviour*. 1981. V. 1. № 29. P. 186–192.
6. *Hrdy S.B.* Mothers and others // Harvard University Press. 2009. P. 422.
7. *Бутовская М.Л.* Антропология пола // Фрязино. 2013. С. 360.
8. *Bogin B.* Evolutionary hypotheses for human childhood // *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*. 1997. P. 63–89.
9. *Hrdy S.B., Hausfater G.* Comparative and evolutionary perspectives on infanticide: introduction and overview // *Infanticide: Comparative and Evolutionary Perspectives*. 1984. P. xiii–xxxv.
10. *Kokko H., Jennions M.D.* The relationship between sexual selection and sexual conflict // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014. V. 6. №. 9. P. a017517.
11. *Boattini A., Sarno S., Pedrini P., et al.* Traces of medieval migrations in a socially stratified population from Northern Italy. Evidence from uniparental markers and deep-rooted pedigrees // *Heredity*. 2015. V. 114. № 2. P. 155–162.
12. *Larmuseau M.H., van den Berg P., Claerhout S., et al.* A historical-genetic reconstruction of human extra-pair paternity // *Current Biology*. 2019. V. 23. № 29. P. 4102–4107.
13. *Wolf M., Musch J., Enczmann J., et al.* Estimating the prevalence of nonpaternity in Germany // *Human Nature*. 2012. V. 23. № 2. P. 208–217.
14. *Scelza B.A., Prall S.P., Swinford N., et al.* High rate of extrapair paternity in a human population demonstrates diversity in human reproductive strategies // *Science advances*. 2020. V. 6. № 8. P. 6195.

## THEORETICAL REPRODUCTIVE OUTCOMES OF THE SEXUAL CONFLICT OVER PARENTAL CARE IN HUMANS

**O. V. Semenova<sup>a,#</sup> and Corresponding Member of the RAS M. L. Butovskaya<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *The Institution of the Russian Academy of Sciences N.N. Miklouho-Maklay Institute of Ethnology and Anthropology,  
Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: m4248296@yandex.ru*

In this paper, the authors presented an updated mathematical model of the evolutionary dynamics of the sexual dispute over care (the “battle of sexes”) and its simulated reproductive outcomes. The authors highlighted a whole range of life-history traits unique to our species, such as prolonged childhood, growth in parental care, etc. Based on these biosocial premises, a sexual conflict between men and women shifts into the mathematical realm of the “Prisoner’s Dilemma” game. The evolutionarily stable strategy of mutual rejection of parenthood would be the dominant of this PD strategy for both parents, and a predicted in previous models’ oscillation dynamic would not be expected. Despite the fatal theoretical prediction of the human reproduction’s PD evolutionary game, the newish genetic data of the EPP rates in the historical populations reveals the prevalence of cooperation between both sexes, predominantly utilizing the monogamous form of sexuality. Authors suppose that this sexual norm could potentially ensure reproductive success in the studied societies in the past.

*Keywords:* monogamy, game theory, prisoner’s dilemma, sexual conflict, demography, human reproduction, parental care, battle of sexes

УДК 597.3

## РЕКОНСТРУКЦИЯ ПАТТЕРНОВ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ РАЗРЯДОВ И МЕХАНИЗМЫ ЭЛЕКТРОГЕНЕРАЦИИ У АФРИКАНСКОГО КЛАРИЕВОГО СОМА *CLARIAS GARIEPINUS* (CLARIIDAE, SILURIFORMES)

© 2021 г. А. А. Орлов<sup>1,\*</sup>, В. М. Ольшанский<sup>1</sup>, В. Д. Барон<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН Д.С. Павловым

Поступило 29.04.2021 г.

После доработки 07.05.2021 г.

Принято к публикации 07.05.2021 г.

Изучены электрические разряды (ЭР) у африканских клариевых сомов *Clarias gariepinus*. При агрессивно-оборонительном поведении в парах особей зарегистрированы нерегулярные монополярные ЭР с длительностью 8–10 мс и более продолжительные и сложные по форме ЭР с характерной изрезанностью амплитудного профиля разряда и продолжительностью 20–50 мс. Путем сложения коротких ЭР с различной латентностью и амплитудой реконструирован паттерн продолжительных разрядов. Рассмотрены условия образования продолжительных ЭР при асинхронной активности электромоторных нейронов и возможности согласованной работы электрогенераторной и электро-рецепторной систем сомов, поскольку увеличение длительности ЭР понижает порог их восприятия.

**Ключевые слова:** электрические разряды рыб, *Clarias*, электрические органы, слабоэлектрические рыбы, электрокоммуникация, электрорецепция

**DOI:** 10.31857/S2686738921050243

Электрические разряды (ЭР) были зарегистрированы у африканского клариевого сома *Clarias gariepinus* [1] вскоре после обнаружения ЭР у некоторых видов перистоусых сомов рода *Synodontis* [2, 3]. Как и у последних, генерация ЭР у клариевого сома происходила, как правило, при агрессивно-оборонительном поведении в парах особей, однако в отличие от перистоусых сомов у них не были обнаружены спонтанные периодические ЭР в микровольтовом диапазоне. При изучении электрической активности азиатских видов клариевых сомов были обнаружены ЭР, сопровождавшие и другие формы поведения, относящиеся к репродуктивному периоду [4, 5].

ЭР электрических рыб формируются за счет суммации ЭР электрических клеток (электроцитов), составляющих электрические органы (ЭО). У большинства электрических рыб генерация ЭР, как правило, высоко синхронизирована, что обеспечивается системой нервного контроля и рядом адаптаций, компенсирующих возможную рассинхронизацию периферических структур [6]. При одновременном срабатывании электроци-

тов нарушается оптимальная суммация их электрических потенциалов, обеспечиваемая последовательно-параллельной анатомической структурой ЭО. Кроме того, даже незначительная временная задержка в активации спайк-генерирующих мембран соседних последовательно соединенных клеток в ЭО может резко ослабить сложение их потенциалов.

Все известные виды “слабоэлектрических” сомов генерируют как простые одно- и двухфазные разряды, так и более сложные и разнообразные по форме разряды с продолжительностью до сотен миллисекунд [1, 7, 8]. Сложные по форме и длительные ЭР являются характерным примером не-синхронно функционирующей электрогенераторной системы, в которой каждый ЭР может являться результатом активности отдельного участка в ЭО. Учитывая то, что почти все известные сомообразные обладают низкочастотными ампупированными электро-рецепторами, неоднократно высказывалось предположение, что образование сложных по форме длительных ЭР с продолжительностью более 20 мс способствует совмещению частотного спектра разрядов с диапазоном максимальной чувствительности электро-рецепторов. Результаты исследований двухфазных ЭР представителей *Synodontis* показали, что механизм образования продолжительных ЭР может быть основан на последовательной временной суммацией коротких

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

\*e-mail: andrey-a-orlov@rambler.ru

“элементарных” разрядов, которые предположительно генерируют отдельные электроциты [9].

В настоящей работе приводятся результаты лабораторного изучения разнообразия паттернов ЭР у африканского клариевого сома *Clarias gariepinus*, а также проведения их реконструкции с помощью графической компьютерной программы.

Исследование выполнено на 8 экземплярах *C. gariepinus* стандартной длины (SL) 160–310 см, приобретенных в Институте прудового хозяйства и доставленных в лабораторию. Рыб содержали группами в двух 200 л аквариумах при постоянной аэрации и активной фильтрации в течение всего периода проведения работ (2.5 мес). Эксперименты проводились при слабой искусственной освещенности (20–80 лк). Температуру и электропроводность воды варьировали в диапазонах соответственно 27.0–29.5°C и 450–550 мкСм/см. На время опытов рыб в разных комбинациях попарно помещали в экспериментальный аквариум размером 40 × 30 × 30 см, наполненный водой из аквариума, в котором рыбы содержались постоянно. Длительность каждого опыта составляла от 30 мин до нескольких часов в зависимости от активности взаимодействий рыб.

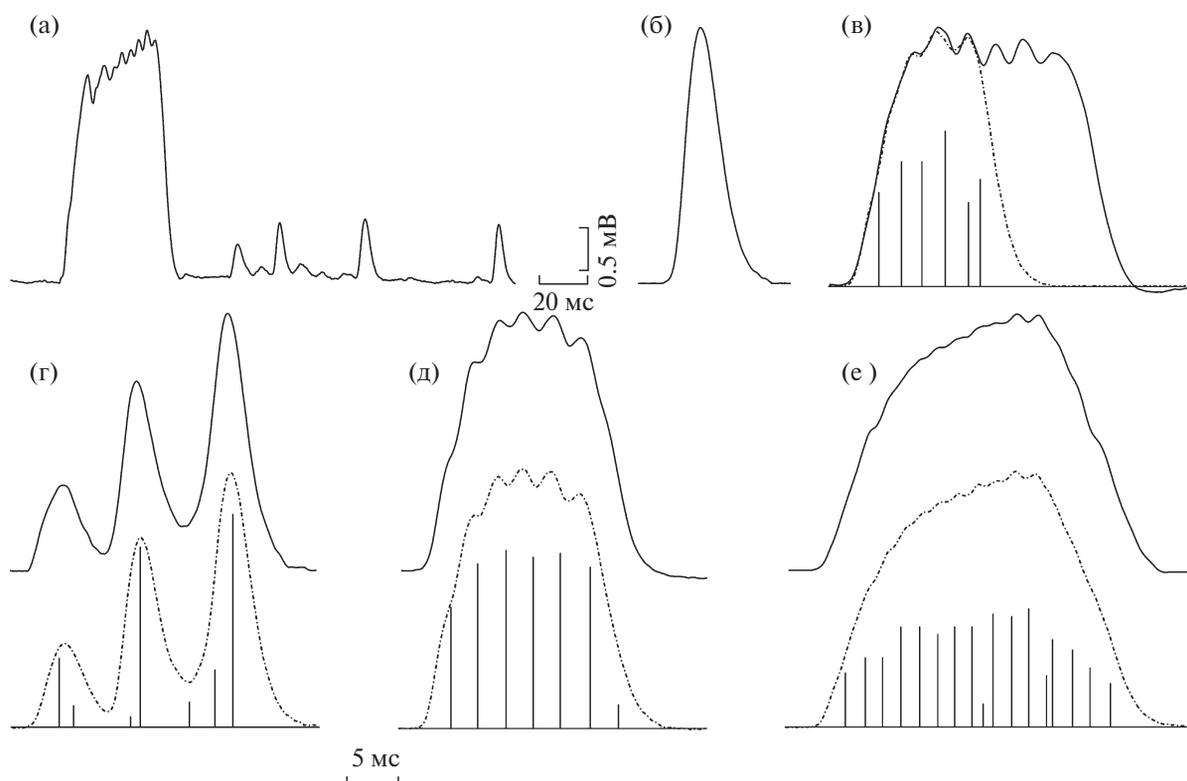
Регистрацию электрических разрядов осуществляли у свободно плавающих рыб с помощью двух пластин из нержавеющей стали, прикрепленных к коротким стенкам аквариума. Усиленные дифференциальным усилителем Isolated Low-Noise Bio-Amplifier (Iso-DAM, WPI) (×100; 0.1 Гц–10 кГц) сигналы поступали на вход мультифункционального устройства для сбора данных Multifunction Data Acquisition (DAQ) Module (USB–6251 BNC, National Instruments), соединенного с ноутбуком и оцифровывались (частота дискретизации 20 кГц, 16 бит). Для записи и анализа сигналов в реальном времени использовали адаптированное к устройству оцифровки собственное программное обеспечение, разработанное в среде LabWindows/CVI. Для реконструкции процесса образования продолжительных электрических разрядов из коротких элементарных импульсов использовалась модифицированная программа, первоначальная версия которой уже применялась ранее [9]. Программа выполнена в виде графического интерфейса и позволяла после импортирования предварительно записанных элементарных разрядов производить их суперпозицию. Изменяя соответствующим образом (как правило поочередно) амплитуды и фазы импульсов, удавалось добиться сходства профиля реконструируемого суммарного ЭР с ранее реально зарегистрированным электрическим разрядом.

Генерация ЭР у двух особей *C. gariepinus*, помещенных в экспериментальный аквариум, происходила, как правило, при агрессивной оборони-

тельных взаимодействиях. У активно взаимодействующих рыб в течение часа регистрировали до сотни ЭР, представляющих собой монополярные импульсы самой разнообразной длительности и формы. Амплитуды ЭР достигали 2–5 мВ при нахождении рыб в центральной части аквариума (рис. 1). В общей сложности в экспериментах зарегистрировано более тысячи ЭР. Длительность большинства ЭР находится в диапазоне 20–50 мс, а максимальная длительность – 125 мс. Форма разрядов варьировала от рассыпанных залпов и отдельных импульсов (рис. 1а, г) до ЭР с характерной изрезанностью верхнего плато (рис. 1в, д, е). Наибольший интерес представили обнаруженные короткие разряды с неизменной формой и длительностью 8–10 мс (рис. 1а, б), практически идентичные таковым, которые были зарегистрированы у клариевых сомов в природных водоемах [1].

Амплитуды коротких одиночных ЭР были существенно меньше, чем у продолжительных разрядов и не превышали 0.6 мВ. Отметим, что эти короткие разряды были записаны лишь у двух из восьми рыб, причем они продолжали генерировать короткие ЭР и в парах с другими особями. Именно эти относительно короткие импульсы, условно отнесенные к “элементарным”, и которые предположительно генерируют отдельные электроциты, использовались в реконструкции слитных продолжительных ЭР.

На рис. 1в представлен один из примеров такой реконструкции, осуществленной лишь для части одного из реально зарегистрированных разрядов путем последовательной суммации шести элементарных ЭР с соответствующими фазовыми сдвигами. Процесс аппроксимации осуществлялся вручную, методом последовательных приближений значений амплитуды и фазы для каждого из слагаемых, до получения удовлетворительного визуального результата – совпадения реального и реконструируемого профиля. Внизу на рис. 1 приводятся результаты реконструкции для трех наиболее характерных ЭР – от состоящего из трех последовательных элементарных разрядов, у которых фазовый сдвиг между ними сравним с длительностью самих разрядов (г), до продолжительного ЭР со сглаженным верхним плато (е), на котором изрезанность или амплитудная модуляция уже мало заметны. Записи всех ЭР на рис. 1, кроме (а), нормированы по амплитуде, однако в реальном случае амплитуды суммарных разрядов, при прочих равных условиях, зависят от величины фазового сдвига между слагаемыми. Чем короче интервалы между слагаемыми элементарными импульсами, тем менее выражена амплитудная модуляция у результирующего ЭР и больше его амплитуда. На рис. 1а, где ЭР представлены в реальном масштабе, амплитуда суммарного разряда примерно в 3–4 раза превосходит величины рассыпанных элементарных ЭР. Вычисления,



**Рис. 1.** Электрические разряды *C. gariepinus*. (а) — ЭР, записанные на интервале 200 мс; (б) — короткий (элементарный) разряд; (г–е) — верхняя запись ЭР различной формы и длительности, внизу пунктиром обозначены соответствующие разряды после реконструкции, длины вертикальных отрезков равны амплитудам суммируемых элементарных разрядов (в относительных единицах по отношению к максимальной амплитуде разряда), а их положение на оси времени равно фазовому сдвигу экстремума каждого слагаемого разряда. Все разряды (б–е) нормированы по амплитуде, отклонение вверх соответствует электроотрицательности области головы. Метка времени 20 мс для (а) и 5 мс для (б–е).

проведенные с помощью используемой программы, показывают, что величина ЭР, образованного суммировавшимися элементарными разрядами одной амплитуды, при уменьшении фазового сдвига между составляющими с 2.5 до 1.5 мс увеличивается в 1.7 раза. Таким образом, при последовательном сложении элементарных ЭР и увеличении как частоты следования слагаемых импульсов, так и интервала времени, на котором происходит процесс суммации, можно одновременно добиться увеличения и длительности, и амплитуды суммарного разряда.

Если допустить, что данная модель, основанная на реконструкции продолжительных ЭР у *C. gariepinus* валидна, то частота генерации элементарных импульсов тесно связана с работой электромоторных нейронов, управляющих активацией отдельных электроцитов, что может накладывать ряд ограничений на функционирование системы в целом. Действительно, увеличение частоты работы мотонейронов, приводящее к ряду изменений, увеличивающих энергетическую эффективность электрогенераторной системы, ограничено периодом рефрактерности эфферентного

нерва, идущего к электроцитам. На рис. 1е, временные периоды, соответствующие частоте генерации элементарных разрядов, составляют  $1.6 \pm 0.4$  мс, что уже близко к критическому значению около 1.3 мс [10]. Дальнейшее увеличение частоты, очевидно, возможно лишь при поочередной несинхронной работе отдельных электромоторных нейронов, привязанных к своим структурным блокам в массиве электроцитов.

Кроме клариевых сомов, локализация электрогенераторных структур которых точно не определена [5], системы с асинхронно работающими электромоторными нейронами присутствуют, вероятно, у перистоусых сомов *Synodontis*, у которых источником ЭР служат модифицированные волокна барабанных мышц, соединенных с плавательным пузырем [2, 11, 12]. Существуют также еще две группы электрических рыб — скаты *Raja* и звездочеты *Astroscopus*, у которых разнообразные паттерны ЭР свидетельствуют о наличии системы асинхронного нервного контроля [13, 14]. У представителей *Raja*, обладающих хорошо развитой электрорецепторной системой, образованной ампулами Лоренцини, продолжительные ЭР, до-

стигающие 0.5 сек и способные, как и у *Clarias* формировать “электрический тетанус”, могут использоваться в совместной работе с электрорецепторами для целей ближней коммуникации. Назначение ЭО у *Astroscopus*, асинхронно работающие электромоторные нейроны у которого вызывают генерацию лишь коротких и различных по амплитуде залпов ЭР, до конца не ясно — поскольку электрорецепторов у этих рыб не обнаружено, то электрическим разрядам отводится возможная роль в охоте на подвижных жертв [15].

В то же время система нервного контроля у *Clarias*, за счет увеличения частоты генерируемых элементарных импульсов и последующей их суммации, может вызывать увеличение как суммарной длительности генерируемых ЭР, так и их амплитуды. Первое является необходимым условием для согласованной работы с системой низко частотных ампулированных электрорецепторов сомовых, второе повысит мощность сигнала и увеличит дальность возможной коммуникации. При этом асинхронность ритма электромоторных нейронов объясняет вариабильность наблюдаемых паттернов монополярных ЭР клариевых сомов при различных формах поведения.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокие благодарности А.О. Касумяну за ряд критических замечаний и ценные советы при подготовке рукописи к печати, Д.Э. Эльяшеву — за разработку программного обеспечения и Н.А. Веретенникову за помощь при проведении экспериментов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baron V.D., Orlov A.A., Golubtsov A.S. // *Experientia*. 1994. V. 50. P. 644–647.
2. Hagedorn M., Womble M., Finger T.E. // *Brain Behav. Evol.*, 1990. V. 35. P. 268–277.
3. Baron V.D., Morshnev K.S., Olshansky V.M., Orlov A.A. // *Anim. Behav.* 1994. V. 48. P. 1472–1475.
4. Ольшанский В.М. // *ДАН*. 2019. Т. 489. № 2. С. 102–106.
5. Olshanskiy V.M., Kasumyan A.O., Moller P. // *Environmental Biology of Fishes*. 2020. V. 103, P. 99–114.
6. Bennett M.V.L. In: *Fish Physiology*, New York: Academic, 1971. V. 5. P. 347–491.
7. Орлов А.А., Барон В.Д., Голубцов А.С. // *ДАН*. 2017. Т. 474. № 5. С. 649–651.
8. Орлов А.А., Барон В.Д., Голубцов А.С. // *ДАН*. 2019. Т. 487. № 6. С. 711–714.
9. Барон В.Д., Орлов А.А. 2021. // *Вопросы ихтиологии*. Т. 61. № 2. С. 219–225.
10. Grundfest H., Bennett M.V.L. In: *Bioelectrogenesis*, Amsterdam: Elsevier, 1961. P. 57–101.
11. Boyle K.S., Colleye O., Parmentier E. // *Proc. R. Soc. B*. 2014. V. 281. P. 20141197.
12. Kever L., Bass A.H., Parmentier E., Chagnaud B.P. // *J. Comp. Neurol.* 2020. V. 528. P. 2602–2619.
13. Bratton B., Ayers J.L. // *Environmental Biology of Fishes*. 1987. V. 20. P. 241–254.
14. Bennett M.V.L., Pappas J.D. // *J. Neurosci.* 1983. V. 3. P. 748–776.
15. Pickens P.E., Mcfarland W.N. // *Anim. Behav.* 1964. V. 12. P. 362–367.

## RECONSTRUCTION OF ELECTRIC DISCHARGE PATTERNS AND ELECTROGENERATION MECHANISMS IN AFRICAN SHARPTOOTH CATFISH *CLARIAS GARIEPINUS* (CLARIIDAE, SILURIFORMES)

A. A. Orlov<sup>a,#</sup>, V. M. Olshanskiy<sup>a</sup> and , and V. D. Baron<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Severtsev Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: andrey-a-orlov@rambler.ru*

Presented by academician of the RAS D.S. Pavlov

Electrical discharges (ED) in the African sharptooth catfish *Clarias gariepinus* were studied. Both in aggressive and defensive behavior, irregular monopolar EDs with a duration of 8–10 ms and longer, and more complex EDs with a characteristic indentation of the discharge pattern and a duration of 20–50 ms, were recorded in pairs of individuals. By adding short EDs with different latencies and amplitudes, the pattern of long discharges was reconstructed. The conditions for the formation of long EDs with asynchronous activity of electromotor neurons and the possibility of coordinated operation of the electric generator and electroreceptor systems in catfish were considered, since an increase in the duration of EDs lowers the threshold of their perception.

**Keywords:** fish electric discharges, *Clarias*, electric organs, weakly electric fish, electroreception, electrocommunication

УДК 593.99

## ОСОБЕННОСТИ ПИТАНИЯ ГЛУБОКОВОДНОГО КИШЕЧНОДЫШАЩЕГО (HEMICHORDATA, ENTEROPNEUSTA, TORQUARATORIDAE) ИЗ БЕРИНГОВА МОРЯ

© 2021 г. О. В. Ежова<sup>1,\*</sup>, М. А. Трухан<sup>1</sup>, А. И. Лукиных<sup>1</sup>, Е. М. Крылова<sup>2</sup>,  
С. В. Галкин<sup>2</sup>, А. В. Гебрук<sup>2</sup>, академик РАН В. В. Малахов<sup>1</sup>

Поступило 25.04.2021 г.

После доработки 19.06.2021 г.

Принято к публикации 19.06.2021 г.

Глубоководные представители полухордовых Torquaratoridae gen. sp. достигают высокой численности до 12 экз./м<sup>2</sup> на глубинах 1830–2130 м на склоне Массива Вулканологов в юго-западной части Берингова моря и доминируют на этом горизонте глубин в донных сообществах. Такое значение численности на два порядка выше, чем зафиксированное ранее. Для выяснения этого феномена было исследовано содержимое кишечника Torquaratoridae gen. sp. В его составе обнаружены преимущественно детрит, панцири планктонных диатомей *Thalassiosira*, *Coscinodiscus*, *Actinocyclus*, *Chaetoceros*, *Neodenticula* и *Grammatophora*, а также остатки скелетов донных беспозвоночных с незначительным добавлением минеральных частиц. Судя по полученным данным, торквараториды относятся к подвижным детритофагам с высокой специализацией к потреблению фитодетрита и способны конкурировать с голотуриями, имея сходные трофические ниши. Необычно высокая численность торквараторид, вероятно, связана с большим количеством органического вещества, поступающего на дно вследствие весеннего “цветения” фитопланктона в поверхностных водах Берингова моря.

**Ключевые слова:** Enteropneusta, Torquaratoridae, содержимое кишечника, диатомовые водоросли, детритофагия, Берингово море

**DOI:** 10.31857/S2686738921050115

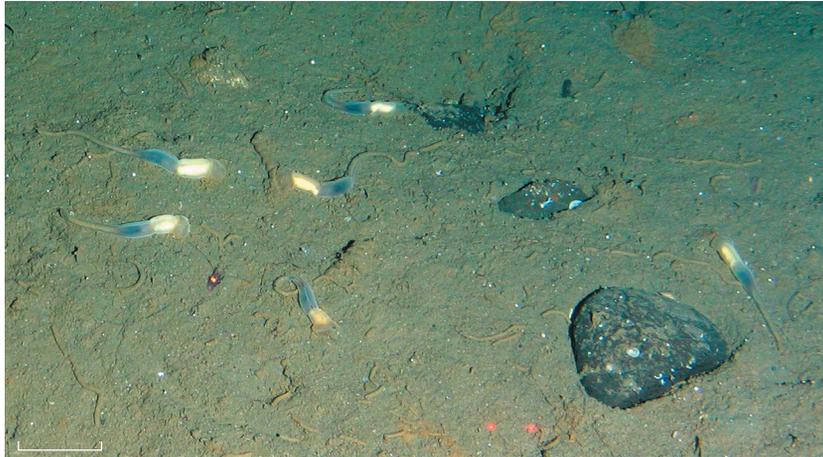
В начале 2000-х годов глубоководные представители полухордовых Enteropneusta были выделены в новое семейство Torquaratoridae [1–4]. Торквараториды существенно отличаются как по строению, так и по образу жизни от других семейств Enteropneusta (Ptychoderidae, Spengelidae и Harrimaniidae), в основном, обитающих на мелководье. У представителей мелководных семейств развит цилиндрический воротниковый отдел. У глубоководных торквараторид воротниковый отдел разрастается в боковых направлениях, формируя широкие латеральные губы, используемые для сбора пищи с поверхности осадка посредством мукоцилиарного механизма [3, 4]. Мелководные кишечнореснитчатые ведут обычно роющий образ жизни, обитая в U-образных норках в толще осадка. Torquaratoridae встречаются на глубинах от 350 до 4000 м, ведут преимуще-

ственно эпибентосный образ жизни и могут даже всплывать в толщу воды [1–4]. Это крупные организмы, достигающие 28 см в длину [2, 4]. Численность торквараторид на дне обычно не высокая, зарегистрированные ранее максимальные значения составляют около 10 экз. на 100 м<sup>2</sup> на глубине 2712–3954 м [5]. При этом характерные спиралевидные или “меандрирующие” фекальные следы их жизнедеятельности могут быть заметным компонентом глубоководных донных ландшафтов [6]. Неожиданно высокая численность торквараторид до 12 экз. на м<sup>2</sup> была зафиксирована недавно в Беринговом море на северном и южном склонах Массива Вулканологов на глубине от 1830 до 2290 м [7, 8] (рис. 1). Этот показатель на два порядка превышал отмеченные ранее максимальные значения. Кроме того, на этом горизонте глубин Torquaratoridae gen. sp. доминировали в донном сообществе, вытесняя с лидирующих позиций голотурий. Биология торквараторид остается слабо изученной. Задачей настоящей работы является изучение питания Torquaratoridae gen. sp. на основании данных о содержимом кишечника.

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

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

\*e-mail: olga.ejova@gmail.com



**Рис. 1.** *Torquaratoridae* gen. sp. в естественной среде обитания на мягком субстрате; южный склон Массива Вулканологов, 1933–1953 м. Фотография сделана ННЦМБ ДВО РАН с применением ТПА “Команч 18”. Масштаб: 10 см.

Материал для нашего исследования был получен в 75-м (2016 г.) и 82-м (2018 г.) рейсах НИС “Академик М.А. Лаврентьев” [7–9] (табл. 1).

Экземпляры *Torquaratoridae* gen. sp., оказавшиеся новым видом, описание которого будет дано в отдельной статье, были сфотографированы *in situ* с применением подводного телеуправляемого аппарата “Команч 18” и зафиксированы для гистологического исследования в 8%-ном растворе формалина, приготовленном на морской воде. Отмывка от фиксатора и дегидратация материала проводилась по стандартной методике в спиртах восходящей концентрации. Содержимое кишечника было изучено у двух экземпляров. Подготовленные для гистологического исследования фрагменты были залиты в парапластовые блоки и разложены с помощью микротома “Leica RM 2125” на серии гистологических срезов толщиной 10 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином Караччи и спиртовым раствором эозина. Фотографии срезов сделаны с помощью микроскопа “Микмед-6” (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия, 2018), снабженного цифровой камерой “МС-12”. Коллекционный номер серии срезов экземпляра, используемого в данной работе, – 2020-QM-05. Для исследования содержимого кишечника с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) извлеченный из кишечника материал был

дегидратирован ацетоном по стандартной методике, высушен в критической точке с использованием CO<sub>2</sub> (“HCP-2 Critical Point Dryer”, Hitachi, 1980) и напылен смесью золото-палладий (“EIKO IB-3 Ion Coater”, 1980), после чего изучен с помощью СЭМ “JSM-6380LA” (JEOL, 2005) в ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова.

При исследовании постпеченочного отдела кишечника *Torquaratoridae* gen. sp. с помощью СЭМ (рис. 2а, 2б) и на гистологических срезах (рис. 2в) видно, что практически весь объем кишечника занимает дисперсная смесь, состоящая из хлопьев детрита и остатков различных организмов (табл. 2). Минеральные частицы встречаются редко. Заметных отличий состава содержимого кишечника у двух исследованных экземпляров, собранных на разных глубинах, не наблюдается.

Чаще всего в содержимом кишечника отмечаются панцири диатомовых водорослей. Разнообразие *Diatomea* очень велико; можно наблюдать как центрические, так и пеннатные формы (рис. 2а, 2б). Из центрических диатомовых основное место занимают представители родов *Thalassiosira* (рис. 2а), *Coscinodiscus*, *Actinocyclus* из класса *Coscinodiscophyceae*. Панцири этих диатомовых водорослей в кишечнике *Torquaratoridae* gen. sp.

**Таблица 1.** Станции НИС “Академик М.А. Лаврентьев”, на которых были собраны *Torquaratoridae* gen. sp.

Рейс	Станция	Дата сбора	Координаты	Глубина, м	Иллюстрации в данной статье
75	LV 75–17	27.06.2016	55.4609°N 167.2688°E	2289	–
82	LV 82–9	18.06.2018	55.3451–55.3466°N 167.2750–167.2752°E	1957–1933	1, 2

встречаются как целиком, так и в виде отдельных фрагментов. Пеннатные диатомовые представлены родами *Neodenticula* (рис. 2б) и *Grammatophora*. Помимо диатомовых водорослей перечисленных родов, обнаружены формы, сходные с *Thalassiothrix longissima* и *Rhizosolenia sp.*, которые наряду с *Thalassiosira trifulta* доминируют по численности в поверхностных отложениях на дне Берингова моря [10].

Кроме того, в содержимом кишечника встречаются мелкоперфорированные обломки панцирей планктонных инфузорий *Parafavella sp.* (рис. 2в), отдельные спикеры демоспонгиевых губок: микросклеры и обломки макросклер (как гладкие, так и снабженные шипиками), элементы известкового скелета офиур и голотурий. Иногда обнаруживаются фекальные пеллеты других животных.

Таким образом, преобладающими компонентами содержимого кишечника *Torquaratoridae* gen. sp. являются детрит и панцири планктонных диатомей, с очень незначительной примесью минеральных частиц. Те же основные компоненты пищевого комка отмечали ранее у различных видов глубоководных голотурий и других детритофагов в Беринговом море [11]. *Torquaratoridae* gen. sp. из нашего материала, вероятно, занимают трофическую нишу, близкую к эпибентосным голотуриям [12].

Торквараториды, как и голотурии, судя по исследованному содержимому кишечника, относятся к детритофагам с высокой специализацией к фитодетриту, наиболее высококалорийной пище для глубоководных детритофагов. Кроме того, подобно голотуриям, торквараториды могут подниматься в толщу воды, используя содержимое кишечника как балласт, который “сбрасывается” перед перемещением в новые места кормления в потоке придонных течений [5].

Крутой склон Массива Вулканологов простирается от глубины примерно 350 м до 4200 м у его основания в Командорской котловине. На всем протяжении склона донные сообщества сменяют одно другое, с довольно узкими вертикальными горизонтами численного доминирования разных видов [7]. Эти горизонты составляют, как правило, 100–300 м, и в диапазоне примерно от 400 до 2300 м смена доминирующих видов сопровождается изменением соотношения мягких осадков и твердых грунтов, иногда представленных галькой, припорошенной осадком [7]. Начиная с глубины около 1400 м вниз по склону среди доминантов на мягких осадках появляются голотурии *Synallactes chuni* и заметную роль начинают играть торквараториды. В горизонте 1830–2130 м и до глубины 2290 м торквараториды доминируют, причем *Synallactes chuni* продолжает встречаться, но уже в меньших количествах. Ниже 2290 м роль доминирующей группы опять переходит к голо-

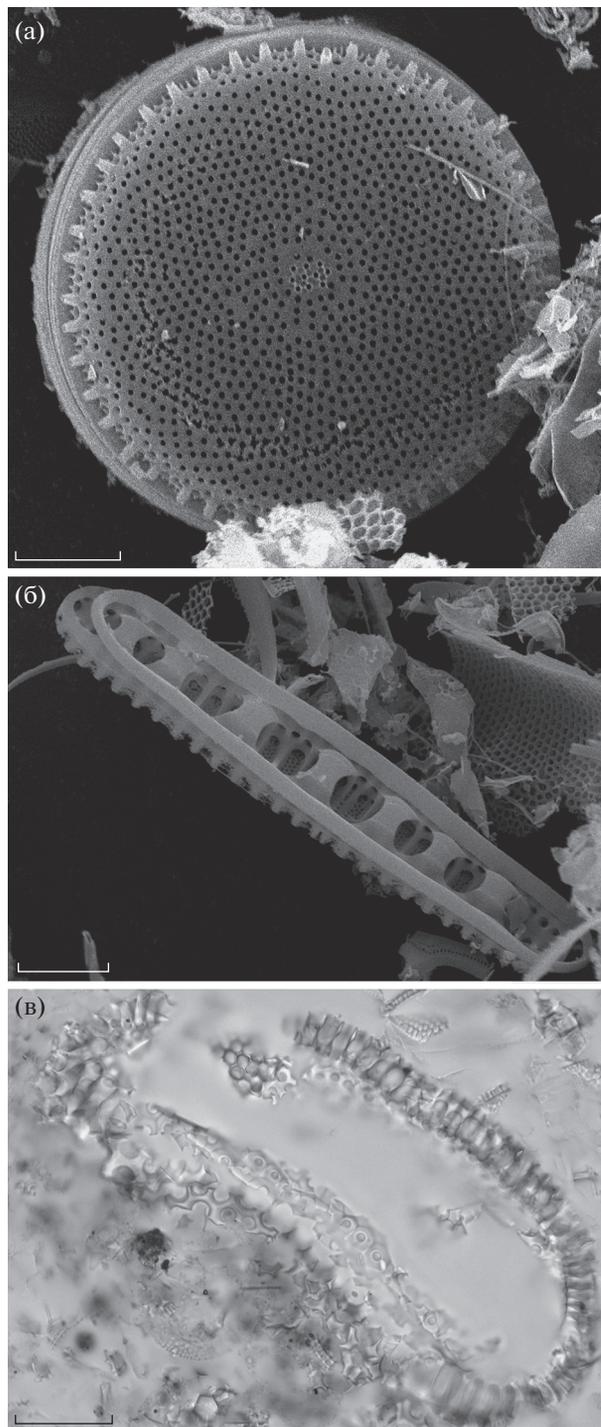


Рис. 2. Остатки организмов, наиболее часто встречающиеся в кишечнике *Torquaratoridae* gen. sp. (а) Панцирь диатомовой водоросли *Thalassiosira sp.* (СЭМ). (б) Панцирь диатомовой водоросли *Neodenticula seminiae* (СЭМ). (в) Фрагмент скелета планктонной инфузории *Parafavella sp.* (фото с гистологического среза). Масштаб: (а, б) – 5 мкм, (в) – 30 мкм.

туриям, а именно к *Paelopatides solea*. На глубинах от 1830 до 2290 м торквараториды не только многочисленны на мягких грунтах, но часто встреча-

**Таблица 2.** Остатки организмов, обнаруженные в кишечнике *Torquaratoridae* gen. sp.

Группа/тип остатков	Роды и виды	Встречаемость на срезах	Иллюстрации в данной статье
Diatomea	<i>Thalassiosira</i>	обильно	2а
	<i>Coscinodiscus</i>	часто	
	<i>Actinocyclus</i>	часто	
	<i>Chaetoceros</i>	часто	
	<i>Neodenticula seminae</i>	часто	2б
	<i>Grammatophora</i>	часто	
Ciliophora (Tintinnina)	<i>Parafavella</i>	нечасто	2в
Demospongiae (спикулы)	—	часто	
Echinodermata (фрагменты скелета)	—	нечасто	
Мелкие чешуйки	?	часто	
Фекальные комочки		нечасто	
Хлопьевидный детрит		обильно	

ются на илах с высоким содержанием твердых фракций (гравия и обломков породы) и на твердых субстратах [7]. Пока трудно сказать, какие особенности биологии малоизученных торквараторид обеспечивают их доминирование, пусть и в узком вертикальном диапазоне, в конкуренции с голотуриями, повсеместно преобладающими на мягких осадках на больших глубинах в океане [13].

Берингово море относится к высокопродуктивным районам Мирового океана [14]. Весеннее “цветение” фитопланктона в западной части Берингова моря начинается в апреле и сопровождается развитием в большом количестве диатомовых водорослей с доминирующим родом *Thalassiosira* [15]. После пика весеннего развития фитопланктона формируется интенсивный поток органического вещества из поверхностных горизонтов моря на дно. Повышенное содержание фитодетрита на дне после весеннего пика сохраняется на протяжении нескольких месяцев [12] и обеспечивает питанием многочисленные популяции детритофагов, в том числе энтеропнеустов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность “Национальному научному центру морской биологии” (ННЦМБ) ДВО РАН за организацию и проведение 75 и 82 рейсов НИС “Академик М.А. Лаврентьев”, а также ФАНО России за финансирование этих экспедиций. Особая благодарность пилотам и техникам, обеспечившим в рейсах работы с применением ТПА “Команч 18”. Авторы глубоко признательны А.А. Георгиеву (кафедра микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в определении остатков планктонных организмов. Авторы благодарны А.В. Кременецкой и Е.И. Рыбаковой (ИОРАН) за

обсуждение экологии и распределения голотурий. Все гистологические работы, а также подготовка к электронно-микроскопическому исследованию осуществлены в студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных ([www.evolmorph.ru](http://www.evolmorph.ru)) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Коллекции серий гистологических срезов хранятся там же. Электронно-микроскопические исследования были проведены с использованием оборудования ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”). Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова № 121032300121-0.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ 18-74-10025, а также частично (анализ подводных фотографий) при поддержке гранта РФФИ 18-05-60228 и гранта 13.1902.21.0012 Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2020-796).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

У авторов нет финансовых или каких-либо иных конфликтов интересов. Все авторы прочли финальную версию рукописи. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

2. *Holland N.D., Jones W.J., Jacob E., et al.* A new deep-sea species of epibenthic acorn worm (Hemichordata, Enteropneusta) // *Zoosystema*. 2009. V. 31. № 2. P. 333–346.
3. *Holland N.D., Kuhnz L.A., Osborn K.J.* Morphology of a new deep-sea acorn worm (class Enteropneusta, phylum Hemichordata): A part-time demersal drifter with externalized ovaries // *J. Morph.* 2012. V. 273. № 7. P. 661–671.
4. *Jabr N., Archambault P., Cameron C.B.* Biogeography and adaptations of torquaratorid acorn worms (Hemichordata: Enteropneusta) including two new species from the Canadian Arctic // *Can. J. Zool.* 2018. V. 96. P. 1221–1229.
5. *Osborn K.J., Kuhnz L.A., Priede I.G., Urata M., Gebruk A.V., Holland N.D.* Diversification of acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) revealed in the deep sea // *Proc. Roy. Soc. (ser. B)*. 2012. V. 279. № 1733. P. 646–1654.
6. *Jones D.O.B., Alt C.H.S., Priede I.G., Reid W.D.K., Wigham B.D., Billett D.S.M., Gebruk A.V., Rogacheva A., Gooday A.J.* Deep-sea surface-dwelling enteropneusts from the Mid-Atlantic Ridge: Their ecology, distribution and mode of life // *Deep Sea Res. II*. 2013. V. 98 (B). P. 374–387.
7. *Rybakova E., Galkin S., Gebruk A., Sanamyan N., Martynov A.* Vertical distribution of megafauna on the Bering Sea slope based on ROV survey // *PeerJ*. 2020. 8: e8628.
8. *Галкин С.В., Мордухович В.В., Крылова Е.М., Денисов В.А., Малютин А.Н., Михайлик П.Е., Полоник Н.С., Санамян Н.П., Шилов В.А., Ивин В.В., Адрианов А.В.* Исследования экосистем гидротермальных выходов и холодных высачиваний в Беринговом море (82-й рейс научно-исследовательского судна “Академик М.А. Лаврентьев”) // *Океанология*. 2019. Т. 59. № 4. С. 687–690.
9. *Галкин С.В., Ивин В.В.* Биологические исследования в Беринговом море с использованием телеуправляемого аппарата “Команч” // *Океанология*. 2019. Т. 59. № 1. С. 153–154.
10. *Katsuki K., Takahashi K.* Diatoms as paleoenvironmental proxies for seasonal productivity, sea-ice and surface circulation in the Bering Sea during the late Quaternary // *Deep Sea Research Part II*. 2005. V. 52. P. 2110–2130.
11. *Соколова М.Н.* Питание и трофическая структура глубоководного макробентоса. М.: Наука, 1986. 208 с.
12. *Witbaard R., Duineveld G.C.A., Kok A., van der Weele J., Berghuis E.M.* The response of *Oneirophanta mutabilis* (Holothuroidea) to the seasonal deposition of phytopigments at the porcupine Abyssal Plain in the North-east Atlantic // *Prog. Oceanogr.* 2001. V. 50. P. 423–441.
13. *Billett D.S.M.* Deep-sea holothurians // *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*. 1991. V. 29. P. 259–317.
14. *Сорокин Ю.И.* Первичная продукция в Беринговом море // *Комплексные исследования экосистемы Берингова моря: Сб. науч. трудов. Отв. ред. В.В. Сапожников*. М.: Из-во ВНИРО, 1995. С. 264–276.
15. *Мордасова Н.В.* Хлорофилл в западной части Берингова моря // *Океанология*. 1994. Т. 34. № 4. С. 557–563.

## FEEDING PECULIARITIES OF DEEP-SEA ACORN WORM (HEMICHORDATA, ENTEROPNEUSTA, TORQUARATORIDAE) FROM THE BERING SEA

O. V. Ezhova<sup>a, #</sup>, M. A. Trukhan<sup>a</sup>, A. I. Lukinykh<sup>a</sup>, E. M. Krylova<sup>b</sup>, S. V. Galkin<sup>b</sup>, A. V. Gebruk<sup>b</sup>, and academician of the RAS V. V. Malakhov<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> *Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

Deep-sea hemichordates Torquaratoridae gen. sp. reach high abundance up to 12 ind. m<sup>-2</sup> at the depth 1830–2130 m on the slope of the Volcanologists Massif in the south-western part of the Bering Sea and dominate the benthic community in this depth layer. Such a value of abundance exceeds by two orders the value recorded earlier. To clarify this phenomenon, we examined the gut contents of Torquaratoridae gen. sp. The most common in the gut contents was the detritus and shells of planktonic diatoms *Thalassiosira*, *Coscinodiscus*, *Actinocyclus*, *Chaetoceros*, *Neodenticula* and *Grammatophora* as well as the remains of skeletons of benthic invertebrates with little admixture of mineral particles. According to obtained data, torquaratorids are mobile deposit feeders with high selectivity to fresh phytodetritus, able to compete with holothurians occupying with them similar trophic niche. Unusually high abundance of torquaratorids apparently is related to high organic matter flux to the seafloor as a result of spring phytoplankton bloom in surface layers of the Bering Sea.

**Keywords:** Enteropneusta, Torquaratoridae, gut contents, Diatomea, deposit feeders, Bering Sea

УДК 612.821.6

## ОСОБЕННОСТИ ЦИКЛА СОН–БОДРСТВОВАНИЕ И ЦИРКАДНОЙ АКТИВНОСТИ МАЛОГО ОЛЕНЬКА (*Tragulus kanchil*)

© 2021 г. О. И. Лямин<sup>1,2,3,\*</sup>, Д. М. Сигал<sup>3</sup>, Р. В. Евсигнеев<sup>4</sup>,  
Е. А. Назаренко<sup>1,2</sup>, академик РАН В. В. Рожнов<sup>1,2</sup>

Поступило 18.05.2021 г.  
После доработки 23.05.2021 г.  
Принято к публикации 23.05.2021 г.

Впервые изучены особенности сна и циркадной ритмики у малого оленька (*Tragulus kanchil*) – самого мелкого (вес 1.5–2.2 кг) представителя базальной группы (Tragulidae) парнокопытных, которые сформировались 40–50 млн. лет назад. В условиях, приближенных к естественным, на 6 животных выполнено 30 сут видеозаписи поведения и 15 сут полисомнографических исследований. Оленьки были активны менее 20% времени суток и 60–80% времени проводили в состоянии покоя. На медленноволновый сон (МС) приходилось  $49.7 \pm 3.7\%$ , на парадоксальный (РЕМ) сон –  $1.7 \pm 0.3\%$  времени суток. Большую часть МС ( $87.0 \pm 4.4\%$  времени) глаза у животных были открыты. Наибольшее количество МС и РЕМ сна регистрировалось в дневное время (09–16 ч) и в первой половине ночи (20–02 ч), наибольшая активность – в сумеречные часы (04–06 и 18–19 ч). Мы предполагаем, что основные параметры сна оленьков определяются в первую очередь экологическими факторами, такими как температурные условия и воздействие хищников, а также размерами тела и особенностями физиологии оленьков.

**Ключевые слова:** сон, РЕМ сон, медленноволновый сон, циркадная активность, экологические факторы, эволюция, малый оленек, *Tragulus kanchil*, оленьковые, копытные

**DOI:** 10.31857/S2686738921050218

Копытные – одна из наиболее интересных групп для сравнительных исследований особенностей сна животных. Эти млекопитающие обитают в разных биотопах, ведут преимущественно стадный образ жизни, среди них много одомашненных видов. Большинство электрофизиологических исследований сна были выполнены на домашних животных [1, 2] и лишь в трех работах исследовали сон диких парнокопытных [3–5]. Общая продолжительность сна у исследованных видов варьирует в диапазоне от 12 до 43% от времени суток, тогда как количество парадоксального сна (РЕМ сон, сокращение от *rapid eye movement*) у всех копытных относительно небольшое – от 1.2 до 7.2% от времени суток [1–5].

Оленьки (Tragulidae, Artiodactyla) – самые мелкие среди копытных млекопитающих. Они обитают в тропических лесах Южной Азии и Африки. Оленьки появились 40–50 млн. лет назад и в течение этого времени практически не изменились [6]. Это единственная сохранившаяся из известных базальных групп парнокопытных. У оленьковых, которых называют “живыми ископаемыми”, имеется ряд морфофизиологических и поведенческих признаков, которые считаются “архаичными” для парнокопытных [7]. Учитывая филогенетическое положение, особенности и размер животных, а также их распространение, оленьки представляют особый интерес для сравнительных исследований сна, в частности понимания роли экологических и эволюционных факторов в формировании параметров сна и проверки ряда гипотез о функции сна.

Задача данного исследования состояла в изучении сна и циркадной ритмики у малого оленька (*Tragulus kanchil*).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Две серии экспериментов были выполнены на 6 взрослых самках оленька (вес 1.7–2.2 кг, длина тела 42–48 см) в национальном парке Бузямап

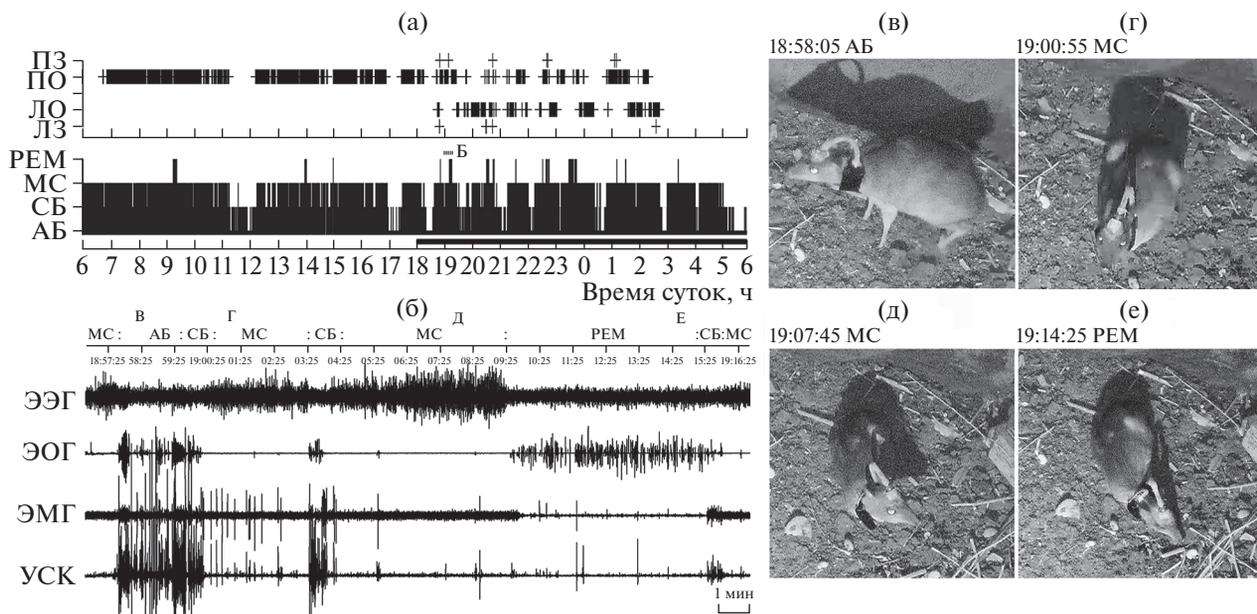
<sup>1</sup> Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Совместный Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, СРВ

<sup>3</sup> Калифорнийский университет в г. Лос-Анджелес, Лос-Анджелес, США

<sup>4</sup> Самарский Университет, Самара, Россия

\*e-mail: oilyamin@yahoo.com



**Рис. 1.** (а) Динамика стадий сна и бодрствования и состояния глаз у малого оленька в течение одного дня. Состояние правого (П) и левого (Л) глаза: О – открыт, З – закрыт. (б) Электрополиграмма АБ, СБ, МС и РЕМ сна длительностью 20 мин. Электроэнцефалограмма (ЭЭГ), электроокулограмма (ЭОГ), электромиограмма (ЭМГ) и ускорение (УСК) во время эпизода, обозначенного пунктирной линией на (а). Стрелки над шкалой времени – время фотографирования. (в–е). Фотографии: АБ (в), МС в позе сфинкса (глаза открыты, отражают ИК-свет) (г, д), РЕМ сон в позе лежа (голова на земле, направленный на камеру глаз закрыт) (е). Темное время суток с 18 до 06 ч.

(Вьетнам). В первой серии методом видеосъемки исследовали особенности поведения оленьков (всего 14 дней у 3 животных). Во второй серии провели полисомнографические исследования с применением телеметрии (15 сут регистрации у 4 животных). Всем животным под общей анестезией были вживлены электроды для регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ) коры головного мозга, электромиограммы шейной мускулатуры и электроокулограммы. Во время экспериментов животные находились по одному в вольере размером  $3.5 \times 3.5$  м с естественной растительностью, в нем находился домик (укрытие) размером  $0.9 \times 0.7 \times 0.7$  м, в котором животные проводили большую часть дневного времени. Режим освещения (рассвет в 06 ч, закат в 18 ч) и шума были естественными. В качестве корма животным два раза в день давали листья кустарников (в 06–07 ч и в 15–16 ч). Кроме того, с деревьев в вольер падали спелые плоды кешью. Электрополиграммы и видеозаписи поведения были обработаны в 20-сек эпохах анализа.

План исследований был одобрен комиссией по биоэтике Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН и Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большую часть дневного времени оленьки находились в укрытии, ночного – в вольере. Две трети времени суток (в среднем  $64.0 \pm 2.1\%$  в серии 1 и  $66.7 \pm 4.7\%$  в серии 2) животные были в состоянии покоя в характерной позе, которая напоминала позу сфинкса: оленьки лежали, оперевшись на грудину, конечности подогнуты под туловище, шея вертикально, голова направлена вперед (рис. 1). Примерно 16% времени ( $18.3 \pm 3.2\%$  в серии 1 и  $14.0 \pm 3.4\%$  в серии 2) оленьки стояли. Меньше 2% времени ( $2.0 \pm 0.9\%$  и  $1.3 \pm 0.3\%$ ) оленьки лежали, вытянув голову вперед и положив на землю. На периоды высокой активности (передвижение по вольеру и кормление) приходилось  $15.7 \pm 4.1\%$  времени в серии 1 и  $18.0 \pm 2.6\%$  в серии 2. Таким образом, продолжительность основных форм поведения у интактных и оперированных оленьков была одинаковой, и более 80% времени животные были неактивны.

Электрополиграммы активного и спокойного бодрствования (АБ и СБ), медленноволнового сна (МС) и РЕМ сна у оленьков не отличались от таковых у других копытных (рис. 16). На бодрствование приходилось  $46.2 \pm 2.9\%$  времени суток, т.е. меньше половины всего дня. Почти 60% этого времени занимало СБ, во время которого в ЭЭГ на фоне низкоамплитудной (характерной для АБ и СБ) активности регистрировались всплески с частотой от 5 до 14 Гц.

В ночное время оленьки спали в основном на открытом пространстве вольера, днем – как правило, в домике. МС характеризовался высокоамплитудными медленными волнами в ЭЭГ с частотой ниже 6 Гц и сниженным мышечным тонусом (рис. 1). На МС приходилось  $49.7 \pm 3.7\%$  времени суток. Практически весь МС ( $96.2 \pm 2.2\%$ ) регистрировался в позе сфинкса и лишь небольшое количество – стоя ( $3.7 \pm 2.2\%$ ). Большую часть МС глаза у оленьков были открыты. Состояние одного или двух глаз было определено для  $47.6 \pm 13.4\%$  эпох МС. В среднем  $87.0 \pm 4.4\%$  этого времени глаза были открыты. В дневное время МС сопровождался частым (3–5 раз/сек) поверхностным дыханием (тепловая одышка) и обильным слюноотделением.

РЕМ сон характеризовался практически непрерывными движениями глаз, еще более низким, по сравнению с МС, мышечным тонусом (вплоть до атонии) и низкоамплитудной ЭЭГ, характерной для состояния бодрствования (рис. 1б). У всех оленьков в ЭЭГ увеличивалась активность в диапазоне тета-ритма (частота 6–7 Гц). В РЕМ сне глаза могли быть закрыты или открыты. Часто веки закрывались и открывались параллельно вздрагиваниям глаз. Продолжительность РЕМ сна у разных животных варьировала от 1.2 до 2.4% времени суток и составляла в среднем  $1.7 \pm 0.3\%$ , или 3.2% от общего количества сна. Всего  $35.3 \pm 6.4\%$  РЕМ сна было зарегистрировано в позе сфинкса и  $64.7 \pm 6.4\%$  в позе лежа (голова на поверхности земли). Длительность эпизодов составляла  $2.0 \pm 0.2$  мин и варьировала от 20 сек до 8 мин. В день регистрировалось  $12.3 \pm 1.5$  эпизодов РЕМ сна.

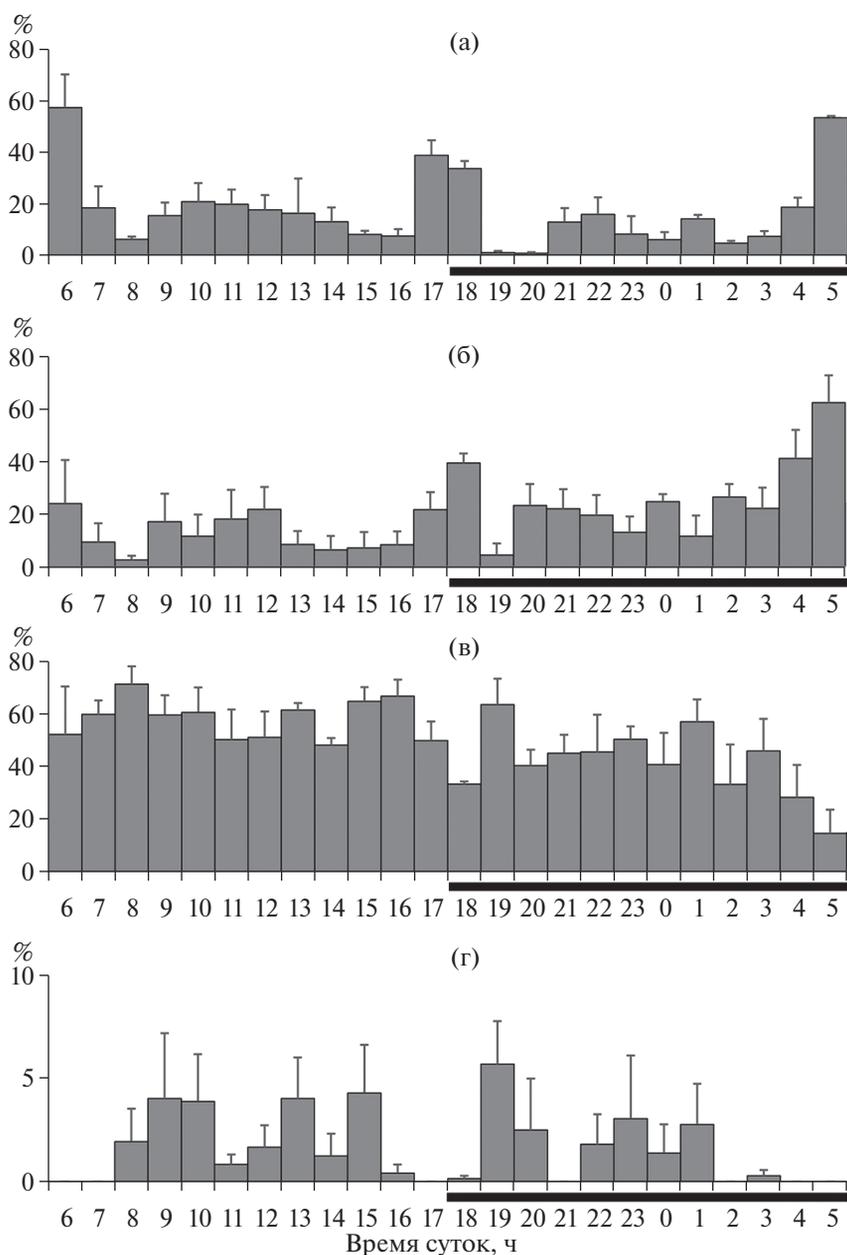
Жвачка (ЖВ, ритмичное пережевывание пищи) регистрировалась у оленьков в СБ и МС. Всего на ЖВ приходилось  $17.0 \pm 3.7\%$  времени суток:  $68.3 \pm 9.1\%$  всей ЖВ регистрировалось во время МС и  $26.8 \pm 7.1\%$  – в СБ. Как и у других копытных [1, 2], ЖВ у оленьков никогда не совпадала по времени с РЕМ сном.

Эпизоды бодрствования и сна у оленьков регистрировались в течение всего дня (рис. 2). В обеих сериях животные были наиболее активны перед рассветом (04–06 ч, до 60% времени) и сразу после заката (18–19 ч, 36%), наименее активны – утром (07–09 ч, 10%) и во второй половине дня (13–17 ч, 8%). Наибольшее количество времени животные проводили в МС в утренние часы (07–09 ч, до 71%), наименьшее – перед рассветом (05–06 ч, 15% времени). В период с 9 ч утра до 5 ч утра следующих суток среднее почасовое количество МС постепенно снижалось. Почасовое количество АБ и МС у оленьков значимо зависело от времени суток (АНОВА с повторениями,  $p < 0.001$  и  $p = 0.008$  соответственно). Эпизоды РЕМ сна совпадали с периодами наибольшего количества МС (08–16 и 19–02 ч).

В результате исследований мы установили, что стадии МС и РЕМ сна у оленьков хорошо дифференцированы, как и у других плацентарных млекопитающих. При этом общее количество МС (49.7% от времени суток или почти 12 ч) у самого маленького из копытных оказалось самым большим среди всех исследованных копытных, а количество РЕМ сна (1.7% от времени суток или 25 мин) – сопоставимым с величинами у других видов [1–5, 8] (рис. 3). Рекордное количество МС у оленьков согласуется с общей тенденцией увеличения продолжительности сна у копытных с уменьшением веса (рис. 3а). Считается, что более крупные травоядные животные должны тратить больше времени на поиск и поедание пищи, что сокращает время для сна. Разнообразная диета оленьков (листья, плоды, грибы, а иногда и насекомые) и небольшие потребности в количестве корма [6] оставляют им больше времени для сна. С другой стороны, низкий уровень активности и большое количество МС делают оленьков также менее заметными для диких кошачьих, для которых мелкие копытные составляют значительную долю добычи. Поэтому главная стратегия противодействия хищникам у оленьков – это затаивание [6, 7]. Наконец, высокая дневная температура воздуха в тропическом лесу (больше 30°C) и узкая термонейтральная зона у оленьков (15–30°C) также могут быть связаны с большим количеством МС и СБ. Интенсивная двигательная активность оленьков в таких условиях приводит к гипертермии [9]. Таким образом, большая продолжительность МС у оленьков согласуется с представлением о сне как о состоянии адаптивной неподвижности, которое снижает или исключает активность животных, когда она нецелесообразна [8, 10].

Небольшое количество РЕМ сна у копытных также часто связывают с тем, что они являются добычей для диких кошек [6]. РЕМ сон сопровождается атонией или сниженным мышечным тонусом, и высокими порогами пробуждения [8, 11, 12]. Оба фактора могут замедлять реакцию животных на опасность. Продолжительность РЕМ сна у оленьков, как и двух других диких видов, исследованных в условиях максимально приближенных к естественным, была самой низкой среди копытных (рис. 3б). С другой стороны, наибольшее количество РЕМ сна было зарегистрировано у домашних животных – пони и свиней [2], одним из основных принципов селекции которых было формирование спокойного отношения к человеку. Следовательно, небольшое количество РЕМ сна у оленьков согласуется с данными о связи между продолжительностью РЕМ сна и защищенностью животных, а также уровнем бдительности во время сна.

Считается, что оленьковые ориентируются в первую очередь на обоняние и слух, тогда как стадные копытные для обнаружения хищников

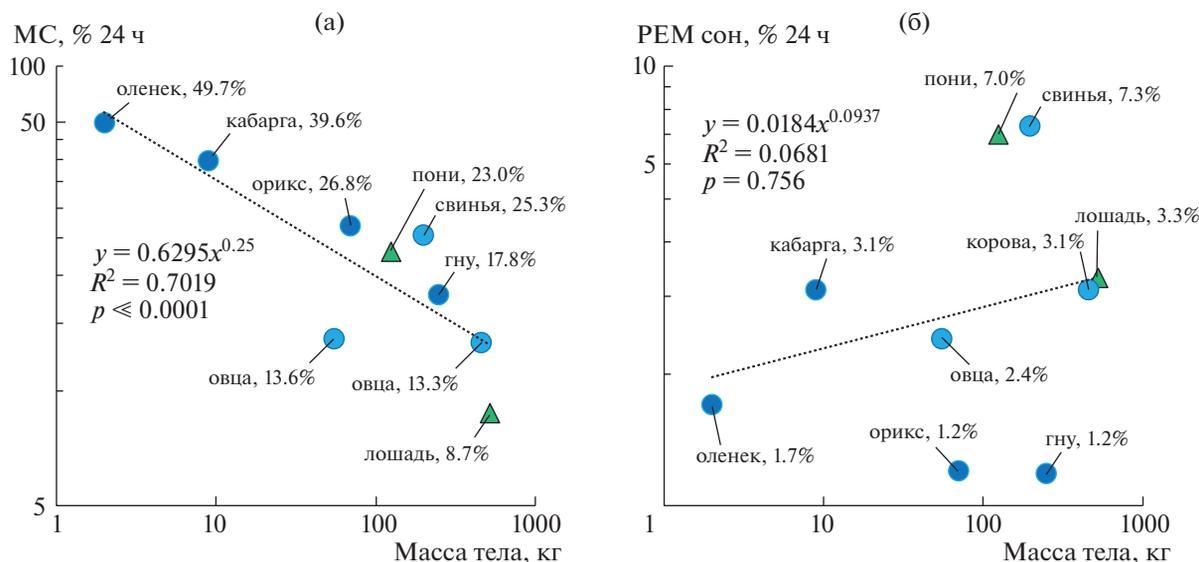


**Рис. 2.** Усредненное почасовое количество АБ, МС и РЕМ сна у оленьков (среднее  $\pm$  S.E.M.). (а) Серия 1 – поведенческие исследования (3 животных, 4–5 дней у каждого), АБ. (б–г) Серия 2 – электрофизиологические исследования (4 животных, 1 день у каждого). (б) АБ, (в) МС, (г) РЕМ сон. Темное время суток с 18 до 06 ч.

используют зрение и коллективную бдительность [6, 7, 13]. Мы установили, что большую часть времени оленьки спали на открытом пространстве с открытыми глазами. Поэтому есть основания предполагать, что оленьки способны обрабатывать зрительную информацию во время МС, что также может способствовать более высокой бдительности. Интересно, что у пони и свиньи при рекордной для копытных продолжительности РЕМ сна глаза во время МС были закрыты [1, 2]. В совокупности эти данные поддерживают идею

о том, что МС с открытыми глазами и небольшое количество РЕМ сна – признаки более настороженного состояния животных.

Небольшое количество РЕМ сна у оленьков может быть связано также с высокой температурой воздуха и особенностями терморегуляции животных. В отличие от МС, РЕМ сон характеризуется нарушением терморегуляции. Так, учащенное дыхание у оленьков (один из способов понижения температуры тела) регистрировалось во время СБ и МС, но прекращалось за некоторое



**Рис. 3.** Соотношение между количеством МС (а) и РЕМ сна (б) и массой тела у копытных. Темно- и светло-синие кружки – дикие и домашние парнокопытные (*Artiodactyla*) соответственно. Треугольники – непарнокопытные (*Perissodactyla*). Данные о количестве сна из работ [1–5, 8].  $R^2$  – коэффициент корреляции,  $p$  – уровень значимости.

время до начала эпизода РЕМ сна и восстанавливалось уже после пробуждения. Во время РЕМ сна у животных также растет температура мозга [14]. Хотя мы не обнаружили у оленьков отличий в количестве и длительности эпизодов дневного и ночного РЕМ сна, но все наиболее продолжительные эпизоды РЕМ сна (4–8 мин) были зарегистрированы у них до 9 ч утра или после 16 ч, т.е. вне наиболее жаркого времени суток. К тому же у оленьков отсутствует система проточного охлаждения поступающей к мозгу крови, которая есть у других видов парнокопытных (так называемая “чудесная сеть” [15]). Таким образом, сниженное количество РЕМ сна может способствовать не только повышению бдительности животных, но и снижению риска перегрева мозга.

Учитывая, что хищники в тропическом лесу могут быть активны в разное время суток [6, 13], сумеречная (крепескулярная) активность оленьков может быть стратегией максимально увеличить активность в периоды наиболее комфортного (с точки зрения температурных условий) времени суток. При этом полифазный сон, а также снижение степени цикличности в виде чередования эпизодов МС и РЕМ сна, делает поведение оленьков пластичным, изменяющимся в зависимости от внешних условий (например, режима активности хищников).

Таким образом, проведенное нами исследование особенностей сна и циркадной ритмики малого оленька в условиях, максимально приближенных к естественным, показало, что эти самые мелкие копытные большую часть времени суток находятся в состоянии покоя и МС, причем МС

сопровождается преимущественно открытым состоянием глаз. Всего на МС у оленьков приходится около половины времени суток (наибольшее количество среди исследованных копытных), а РЕМ сон очень краток (как у диких видов). Другие важные особенности оленьков – сумеречный характер активности, полифазный сон, сниженная цикличность стадий сна. Мы не обнаружили каких-либо признаков связи между параметрами сна у оленьков и их филогенетическим статусом. Полученные нами данные предполагают, что особенности цикла сон–бодрствование у оленьков определяются в первую очередь экологическими факторами, такими как характер питания, температурные условия и воздействие хищников, а также размерами тела и особенностями физиологии оленьков.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А. Трошенко за изготовление телеметрической системы.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены в рамках госзадания ИПЭЭ РАН по теме НИР Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruckebusch Y. // *Anim Behav.* 1972. V. 20. P. 637–643.
2. Dallaire A., Ruckebusch Y. // *Can. J. Comp. Med.* 1974. V. 38. № 1. P. 65–67.

3. Соколов В.Е., Мухаметов Л.М., Приходько В.И., и др. // Доклады Академии Наук СССР. 1988. Т. 302. № 4. С. 1005–1009.
4. Davimes J.G., Alagaili A.N., Bhagwandin A. et al. // Sleep. 2018. V. 41. № 5.
5. Malungo I.B., Gravett N., Bhagwandin A., et al. // IBRO Neuroscience Reports. 2021. V. 10. P. 142–152.
6. Meijaard E. In: Handbook of the Mammals of the World. V. 2. Hoofed Mammals. Madrid: Lynx Editions, 2011. P. 320–335.
7. Janis C. In: Living fossils. Springer-Verlag: New York, 1984. P. 87–94.
8. Siegel J.M. // Nature. 2005. V. 437. № 7063. P. 1264–1271.
9. Whittow G.C., Scammell C.A., Leong M. et al. // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 1977. V. 56. № 1. P. 23–26.
10. Siegel J.M. // Nature Rev Neurosci. 2009. V. 10. № 10. P. 747–753.
11. Тувьер В.Н., Уильямс Г. // Behavioral biology. 1972. V. 7. № 2. P. 205–215.
12. Ermis U., Krakow K., Voss U. // J. Sleep Res. 2010. V. 19. № 3. P. 400–406.
13. Рожнов В.В. Опосредованная хемокоммуникация в социальном поведении млекопитающих. М.: Т-во научных изданий КМК. 2011. 288 с.
14. Kovalzon V.M. // Physiol Behav. 1973. V. 10. № 4. P. 667–670.
15. Fukuta K., Kudo H., Sasaki M., et al. // J. Anat. 2007. V. 210. № 1. P. 112–116.

## CHARACTERISTICS OF SLEEP-WAKEFULNESS CYCLE AND CIRCADIAN ACTIVITY IN THE LESSER MOUSE-DEER (*TRAGULUS KANCHIL*)

**O. I. Lyamin<sup>a,b,c,#</sup>, J. M. Siegel<sup>c</sup>, R. V. Eysigneev<sup>d</sup>, E. A. Nazarenko<sup>a,b</sup>,  
and academician of the RAS V. V. Rozhnov<sup>a,b</sup>**

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

<sup>b</sup> *Joint Russian-Vietnam Tropical Research and Technological Centre, Hanoi, Vietnam*

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

<sup>d</sup> *Samara University, Samara, Russian Federation*

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

The pattern of sleep and circadian activity of the lesser mouse-deer (*Tragulus kanchil*), the smallest (body mass between 1.5 and 2.2 kg) representative of the basal group (Tragulidae) of even-toed ungulates which evolved 40–50 m.y.e. ago, were studied. In naturalistic conditions, a total of 30 of full-day video of the animal behavior and 15 days of 24-h polysomnographic data were collected in 6 animals. The mouse-deer were active less than 20% of 24-h and were quiescent during 60–80% of the remaining time. Slow wave sleep (SWS) accounted for on average  $49.7 \pm 3.7\%$  of 24-h and paradoxical (rapid eye movement, REM) sleep –  $1.7 \pm 0.3\%$  of 24-h. During the majority of SWS ( $87.0 \pm 4.4\%$ ) the eyes were open. The most of SWS and REM sleep occurred during the daytime hours (09–16) and in the first half of the night (20–02). The animals were most active during twilight hours (04–06 и 18–19). We suggest that the main features of sleep in the mouse-deer are largely determined by ecological factors, including environmental temperature and predation, as well as the size and physiology of the mouse-deer.

**Keywords:** sleep, REM sleep, slow wave sleep, circadian activity, ecology, evolution, the lesser-mouse deer, *Tragulus kanchil*, Tragulidae, ungulates

УДК 577.2

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРОДСТВА ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ РНК-ХЕЛИКАЗЫ DDX3 К ХАРАКТЕРНЫМ ЭЛЕМЕНТАМ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ мРНК

© 2021 г. А. Б. Шикалов<sup>1</sup>, О. В. Сергеева<sup>1</sup> \*, Т. С. Зацепин<sup>1,2</sup>

Предоставлено академиком РАН О.А. Донцовой

Поступило 15.04.2021 г.

После доработки 02.05.2021 г.

Принято к публикации 03.05.2021 г.

РНК-хеликаза DDX3 участвует во многих процессах, обеспечивающих метаболизм РНК в клетках эукариот. Было показано, что DDX3 также участвует в процессе инициации трансляции, как кэп-зависимой, так и IRES-зависимой. Однако до сих пор не были определены параметры вторичной структуры 5'-нетранслируемых областей (НТО) мРНК, для эффективной трансляции которых необходима РНК-хеликаза DDX3. Мы произвели биоинформатический анализ данных вторичных структур 5'-НТО в DDX3-зависимых мРНК *in silico* и предсказали, что длина 5'-НТО для таких мРНК меньше среднестатистической, а также необходимость наличия шпилечных структур в области первых 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК.

**Ключевые слова:** РНК-хеликаза, структура РНК, мРНК

**DOI:** 10.31857/S2686738921050280

РНК-хеликазы используют энергию гидролиза нуклеозид-5'-трифосфатов для расплетания вторичной структуры РНК, что необходимо для функционирования РНК и РНК-белковых комплексов в клетке. РНК-хеликаза DDX3 играет важную роль в различных клеточных процессах, включая транскрипцию, сплайсинг, синтез белка, клеточный цикл, апоптоз, врожденный иммунный ответ, а также репликацию вирусов [1, 2]. Количество DDX3 меняется при трансформации клеток, поэтому хеликаза является потенциальной мишенью для лечения онкологических заболеваний [3]. Одним из открытых вопросов для этой хеликазы является вклад в процесс инициации трансляции в клетках эукариот [4, 5]. Предполагается, что РНК-хеликаза DDX3 участвует в расплетании стабильных вторичных структур в непосредственной близости от 5'-конца мРНК [4]. Однако для гомолога DDX3 в дрожжах — хеликазы Ded1p — показано участие в расплетании шпилечных структур на расстоянии больше 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК [6]. Таким образом, необходимы дополнительные исследования, посвященные особенностям вторичной структуры

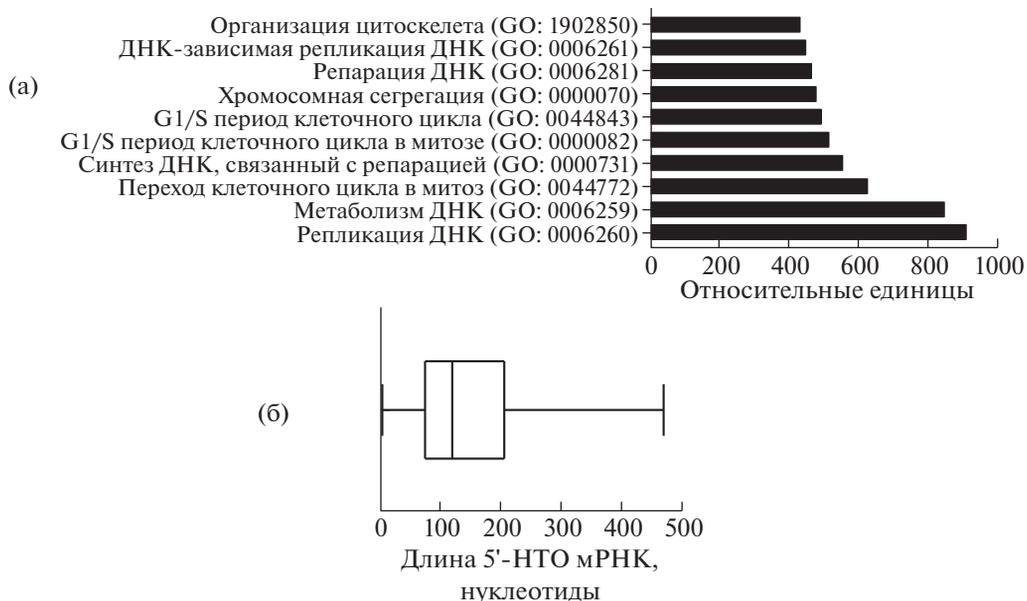
мРНК, для трансляции которых привлекается РНК-хеликаза DDX3. Чтобы определить типы вторичных структур в мРНК, в расплетании которых участвует РНК-хеликаза DDX3, мы проанализировали данные транскриптома для линии клеток MCF7 после ингибирования хеликазы DDX3 [7]. Отсортировав данные по степени изменения уровня экспрессии генов и доверительно-му интервалу ( $p < 0.05$ ), мы определили 932 гена, на экспрессию мРНК которых влияет снижение уровня DDX3. Для полученного списка был выполнен анализ обогащения по функциональной принадлежности с использованием онлайн сервера Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), чтобы определить биологические процессы, на которые в первую очередь влияет снижение DDX3 [8] (рис. 1а). Полученные данные были первично отсортированы по доверительному интервалу ( $p < 0.05$ ), а затем по относительным единицам Enrichr, которые представляют собой значения после дополнительной поправки на тест Фишера.

Далее мы проанализировали последовательности 5'-нетранслируемых областей (НТО) из 550 мРНК (включая изоформы), соответствующие списку генов, полученных нами на предыдущем этапе, с помощью ENSEMBL biomaRt (база данных ENSEMBL Genes 100, сборка генома человека GRCh38.p13), определили их длины и оценили распределение длин 5'-НТО для мРНК, экспрессия которых менялась при снижении количества DDX3 (рис. 1б). Мы определили, что

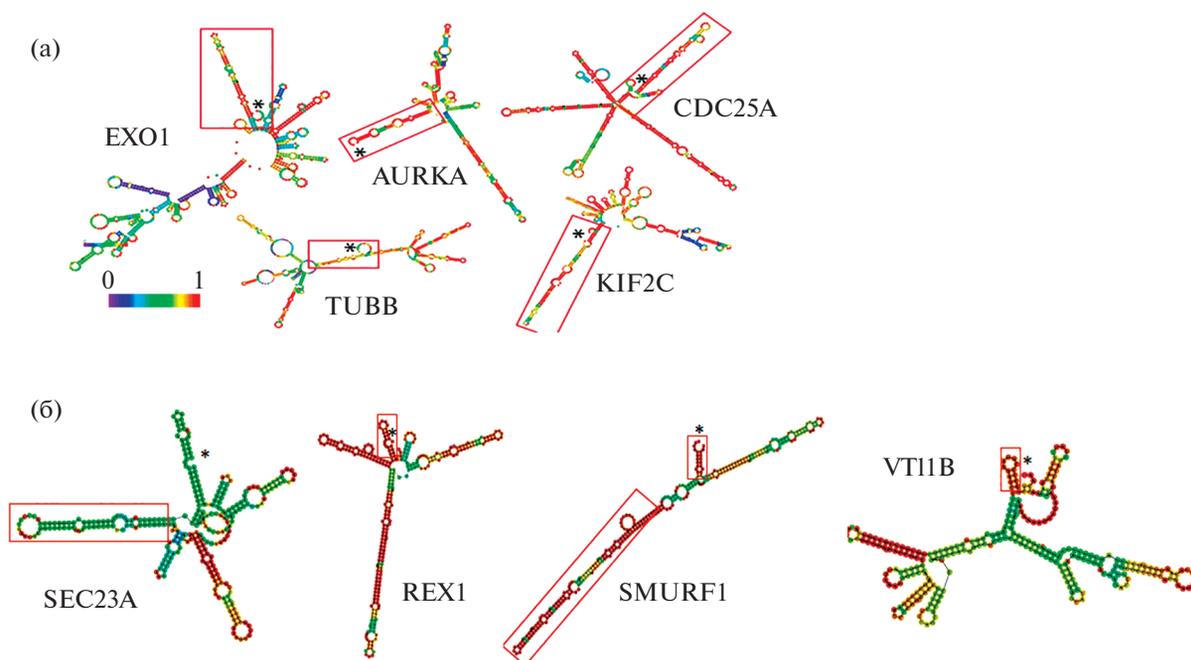
<sup>1</sup> Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

<sup>2</sup> Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: O.Sergeeva@skoltech.ru



**Рис. 1.** (а) Список биологических процессов с наиболее значимыми изменениями после подавления экспрессии DDX3, отсортированные по доверительному интервалу ( $<0.05$ ) и относительным единицам Enrichr. (б) Распределение длин 5'-НТО для 550 мРНК, экспрессия которых была снижена при подавлении DDX3 в клетках MCF7.



**Рис. 2.** (а) Примеры предсказания вторичных структур участков 5'-НТО для DDX3-зависимых мРНК из клеток MCF7. Цветовой код показывает вероятность образования комплементарной пары от 0 (фиолетовый) до 1 (красный). (б) Примеры предсказания вторичных структур 5'-НТО для DDX3-зависимых мРНК, для которых наблюдалось снижение эффективности трансляции. Красными прямоугольниками выделены 5'-концевые участки мРНК, а \* отмечен 5'-конец.

большинство значений длин 5'-НТО мРНК составляют от 72 до 208 нуклеотидов. Также мы проанализировали области мРНК, содержащие 5'-НТО и первые 200 нуклеотидов из кодирующей после-

довательности белка (извлеченной с помощью инструмента ENSEMBL biomaRt, база данных ENSEMBL Genes 100, сборка генома человека GRCh38.p13).

Мы использовали программу Vienna RNAfold [9], которая позволяет строить модели вторичной структуры РНК на основе минимизации свободной энергии и предсказывает относительную стабильность вторичных структур. Результаты анализа для нескольких мРНК приведены на рис. 2 в качестве примера.

На основании этих данных нами был сделан вывод о том, что мРНК, уровень которых зависит от количества хеликазы DDX3 в клетке, чаще всего имеют стабильную шпильчатую структуру в области первых 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК (рис. 2а). Для проверки полученных результатов мы провели аналогичный анализ данных рибосомного профайлинга в условиях ингибирования хеликазы DDX3, которые также подтвердили наличие стабильных вторичных структур в начале 5'-концевого НТО мРНК (рис. 2б) [10].

Таким образом, в ходе данной работы мы выявили особенности вторичной структуры 5'-НТО мРНК, уровень экспрессии и эффективность трансляции которых зависят от количества РНК-хеликазы DDX3. мРНК, уровень экспрессии которых в клетке зависит от РНК-хеликазы DDX3, имеют укороченные 5'-НТО (не более 208 нуклеотидов, с медианой 129 нуклеотидов), по сравнению со средней длиной 5'-НТО мРНК человека [10]. Также мы предсказали наличие стабильных элементов вторичной структуры РНК (шпилек) на участке первых 50 нуклеотидов от 5'-конца мРНК, эффективность трансляции которых зависит от уровня РНК-хеликазы DDX3. Можно предположить, аппарат трансляции в эукариотической клетке привлекает дополнительные РНК-

хеликазы, например DDX3, для расплетания вторичных структур мРНК, расположенных близко к 5'-концу из-за стерических затруднений для работы канонической хеликазы в составе трансляционной машины [4].

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-74-00119.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kukhanova M.K., Karpenko I.L., Ivanov A.V. // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 1015–1031.
2. Bol G.M., Xie M., Raman V. // *Mol Cancer*. 2015. V. 14. P. 188–204.
3. Fuller-Pace F.V. // *RNA Biol*. 2013. V. 10. P. 121–132.
4. Soto-Rifo R., Rubilar P., Limousin T., et al. // *EMBO J*. 2012. V. 31. P. 3745–3756.
5. Hilliker A., Gao Z., Jankowsky E., Parker R. // *Mol Cell*. 2011. V. 43. P. 962–972.
6. Sen N.D., Zhou F., Ingolia N.T., et al. // *Genome Res*. 2015. V. 25. P. 1196–1205.
7. Cannizzaro E., Bannister A., Han N., et al. // *FEBS Lett*. 2018. V. 592. P. 1873–3468.
8. Kuleshov M., Jones M., Rouillard A., et al. // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. P. W90–W97.
9. Lorenz R., Bernhart S.H., Höner Zu Siederdisen C., et al. // *Algorithms Mol Biol*. 2011. V. 6. P. 26–40.
10. Calviello L., Venkataramanan S., Rogowski K., et al. // *BioRxiv*. 2019. P. 1–22.
11. Pesole G., Mignone F., Gissi C., et al. // *Gene*. 2001. V. 276. P. 73–81.

## DETERMINATION OF THE AFFINITY OF EUKARYOTIC DDX3 RNA HELICASE TO THE CHARACTERISTIC ELEMENTS OF mRNA SECONDARY STRUCTURE

A. B. Shikalov<sup>a</sup>, O. V. Sergeeva<sup>a,#</sup>, and T. S. Zatsepin<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Center for Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

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

<sup>#</sup>e-mail: O.Sergeeva@skoltech.ru

Presented by academician of the RAS O.A. Dontsova

DDX3 RNA helicase is involved in many processes of RNA metabolism in eukaryotic cells. Many studies of DDX3 have shown that it is also involved in the translation initiation process, both cap-dependent and IRES-dependent. However, the specificity of the 5'-UTR secondary structure of mRNA, which require DDX3 RNA helicase for the effective translation, has not yet been determined. We performed a bioinformatic analysis of the 5'-UTR secondary structures in the pool of DDX3-dependent mRNAs *in silico* and found that the length of 5'-UTR is less than the average for the genome, and there are also characteristic hairpin structures in the region of the first 50 nucleotides from the 5'-end of the mRNA.

**Keywords:** RNA helicase, RNA structure, mRNA

УДК 616.211-089, 615.849.19.03:616-002

## НИЗКОИНТЕНСИВНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ТЕРАПИЯ КАК МЕТОД СНИЖЕНИЯ СТРЕССОВЫХ РЕАКЦИЙ ПОСЛЕ СЕПТОПЛАСТИКИ

© 2021 г. И. В. Кастыро<sup>1,\*</sup>, В. И. Попадюк<sup>1</sup>, Г. М. Мурадов<sup>1</sup>, академик РАН И. В. Решетов<sup>2</sup>

Поступило 19.04.2021 г.

После доработки 23.04.2021 г.

Принято к публикации 25.04.2021 г.

Целью исследования являлась оценка эффективности применения фотобиомодуляционной терапии (ФБМТ) с целью минимизации острого болевого синдрома в раннем постоперационном периоде у пациентов после проведения септопластики. 62 пациентам была проведена септопластика под общей анестезией (40 мужчин и 22 женщины, 18–44 лет) с последующей тампонадой полости носа. Пациенты 1-й группы ФБМТ не проводилась, а пациентам 2-й группы – ФБМТ через 3, 6 и 24 ч после септопластики (инфракрасное импульсное лазерное излучение,  $\lambda$  0.890 мкм, P10 Вт, 2 мин в проекции крыльев носа). Через 48 ч, после удаления тампонов, – интраназальная ФБМТ с насадкой в красном диапазоне, с  $\lambda$  0.63 мкм, P 8 мВт, 2 мин. Оценивали ULF, HF, LF и общую мощность вариабельности сердечного ритма (ВСР), болевой синдром. ULF, LF, HF, общая мощность ВСР были достоверно ниже во 2-й группе, по сравнению с первой. В период с 6 до 24 ч после септопластики пациенты 1-й группы испытывали боль выше, чем пациенты с ФБМТ ( $p < 0.001$ ). Применение ФБМТ после септопластики на фоне тампонады носа способствует снижению выраженности болевого синдрома, уменьшению воспалительного ответа на хирургический стресс, а следовательно, и менее выраженным изменениям вегетативной нервной системы в ответ на хирургический стресс.

*Ключевые слова:* септопластика, боль, фотобиомодуляция, вариабельность сердечного ритма

DOI: 10.31857/S2686738921050176

### ВВЕДЕНИЕ

Особое положение занимает вопрос реабилитации пациентов после септопластики. Септопластика провоцирует дисбаланс вегетативной нервной системы, болевой синдром после операции, что подтверждается изменениями баланса вегетативной нервной системы (ВНС) и изменениями вариабельности сердечного ритма (ВСР) [1, 2].

Для уменьшения проявления побочных явлений после септопластики таких, как боль, отек тканей, воспаление, экхимоз и др. в последнее время все чаще применяется низкоинтенсивная лазерная терапия (НИЛТ) [3], которая основана на принципе ускорения репарации тканей, а следовательно, и заживлению хирургической раны

[4]. При НИЛТ используются лазеры или световые диоды (светодиоды) с длиной волны 600–1000 нм и мощностью менее 500 мВт на диод [5], что приводит к увеличению синтеза АТФ в митохондриях, передаче сигнала в биологических мембранах, синтеза ДНК, пролиферации клеток, модуляции про- и противовоспалительных медиаторов, приводящих к уменьшению боли и воспаления [6].

Обзор литературы показывает, что после септопластики НИЛТ применяется интраназально уже после удаления тампонов, либо сразу в случае наложения сплинтов [7]. При этом практически отсутствуют данные, где проведена оценка эффективности НИЛТ при воздействии во время тампонады в первые двое суток после септопластики.

Цель исследования: оценить эффективность применения НИЛТ для уменьшения стрессовых реакций после проведения септопластики.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Со всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

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

\*e-mail: ikastyro@gmail.com



Рис. 1. Визуально-аналоговая шкала оценки интенсивности острого болевого синдрома.

62 пациентам была проведена септопластика под общей анестезией (40 мужчин и 22 женщины, 18–44 года). Пациенты были распределены на 2 группы по 31 пациенту с равным количеством мужчин и женщин в обеих группах. После операции устанавливалась передняя тампонада носа поролоновыми тампонами в перчаточной резине на 2 сут. Всем пациентам септопластика проводилась с использованием местной инфильтрационной анестезии и общей анестезии. С целью профилактики развития острого бактериального воспаления околоносовых пазух была назначена пероральная антибактериальная терапия азитромицина 500 мг однократно утром в течение трех дней с первым приемом утром в день операции.

Через 3, 6 и 24 ч после септопластики пациентам 2-й группы проводилась НИЛТ. Головки излучателя генерировали инфракрасное импульсное лазерное излучение с длиной волны 0.890 мкм и установленной мощностью 10 Вт. Головки излучателя устанавливались в проекции латерального хряща и большого хряща крыла носа с обеих сторон в течение 2 мин. Через 48 ч после операции удаляли тампоны носа пациентам обеих групп и во 2-й группе проводили интраназальную НИЛТ терапию с насадкой в непрерывном, модулированном режиме работы в красном оптическом диапазоне, с длиной волны 0.63 мкм и с мощностью излучения 8 мВт. Головки устанавливались в обе половины носа на 2 мин.

Проводили суточную запись электрокардиограммы (ЭКГ) по Холтеру с помощью аппаратов МТ-200 (Schiller, Swiss). Изучались параметры вариабельности сердечного ритма (ВСР) в частотном диапазоне – низкие частоты (LF, мс<sup>2</sup>), ультранизкие частоты (ULF, мс<sup>2</sup>), высокие частоты (HF, мс<sup>2</sup>) и общая мощность (Total power, мс<sup>2</sup>).

Болевой синдром оценивался при помощи визуально-аналоговой шкалы (рис. 1) через 1, 3, 6, 12, 24 и 48 ч после септопластики, а во второй группе сразу же после проведения сеансов лазерной терапии. Пациентов просили поставить вертикальную линию или точку в том месте шкалы, которое, по их мнению, соответствовало испытываемой ими боли. Длина шкалы составляла 100 мм. Интенсивность боли измеряли в мм.

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием программного пакета JASP, версия 0.14.0 (University of Amsterdam, The Netherlands) для Windows®. Величина боли, LF, ULF, HF, Total power были представлены как

среднее ± ошибка средней ( $M \pm SE$ ) и проанализированы с помощью *t*-критерия независимых выборок после проверки нормальности с помощью теста Шапиро–Уилка.

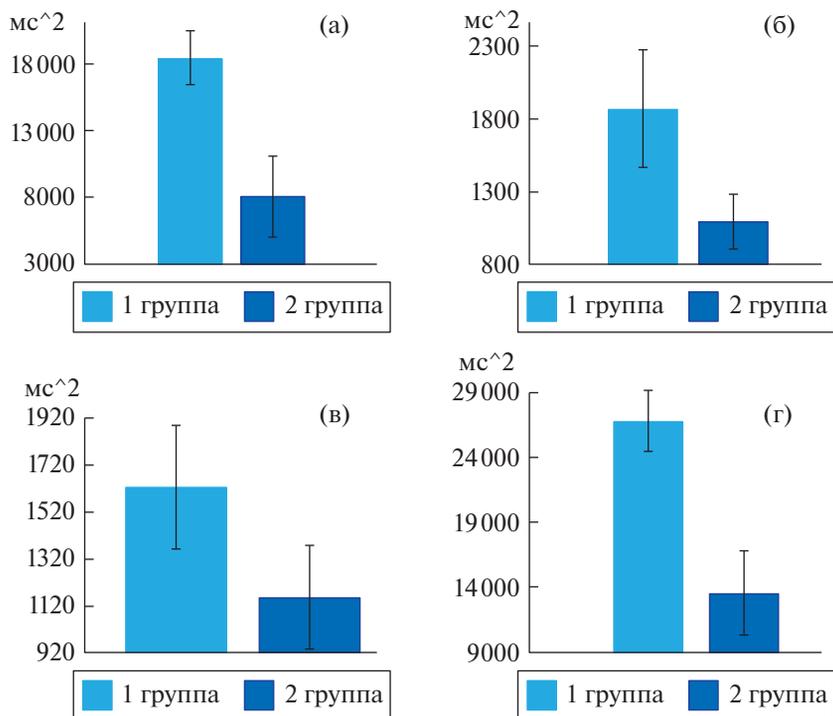
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

После НИЛТ терапии ULF был достоверно ниже во 2-й группе ( $8086 \pm 3003$  мс<sup>2</sup>), по сравнению с 1-й ( $18580 \pm 2067$  мс<sup>2</sup>) ( $p < 0.001$ ) (рис. 2а). LF был значимо выше в 1-й группе ( $1871 \pm 405$  мс<sup>2</sup>), по сравнению со 2-й ( $1095 \pm 190$  мс<sup>2</sup>) ( $p < 0.005$ ), что свидетельствует о повышении напряжения симпатического отдела ВНС в группе без применения НИЛТ (рис. 2б). На основании анализа HF было зафиксировано понижение активности парасимпатической нервной системы за периоперационные сутки в целом также во 2-й группе –  $1157 \pm 220$  мс<sup>2</sup> против  $1630 \pm 263$  мс<sup>2</sup> в 1-й группе ( $p < 0.01$ ) (рис. 2в). Во 2-й группе общая мощность ВСР была достоверно ниже ( $13498 \pm 3226$  мс<sup>2</sup>), чем в 1-й группе ( $26808 \pm 2371$  мс<sup>2</sup>) ( $p < 0.001$ ) (рис. 2г).

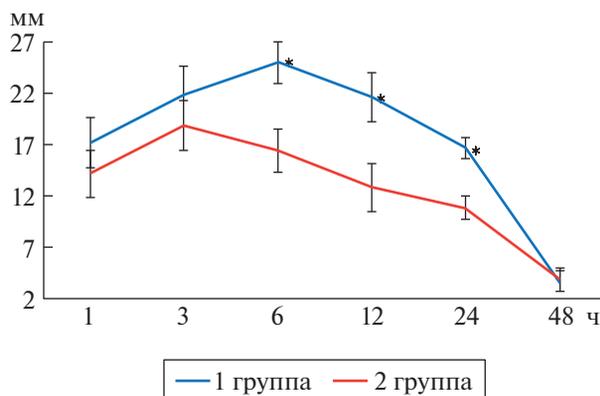
В 1-й группе интенсивность боли через 6 ч увеличилась, по сравнению с 3 ч после операции, но достоверного отличия не было зафиксировано. Через 6 ч во 2-й группе интенсивность болевого синдрома начала снижаться, по сравнению с предыдущим сроком ( $p < 0.05$ ) (рис. 3). Далее болевой синдром продолжил снижаться в обеих группах и через 48 ч после септопластики пациенты либо не ощущали боли, либо она была минимальна и не причиняла явного дискомфорта. При этом в период с 6 до 24 ч после хирургического вмешательства пациенты, которым не проводилась НИЛТ, испытывали боль достоверно выше, чем пациенты с НИЛТ ( $p < 0.001$ ) (рис. 3).

Общепринятой теорией механизма биологического воздействия НИЛТ является поглощение света хромофорами [8]. НИЛТ приводит к следующим эффектам: уменьшение отека и воспаления, уменьшение боли, синтез коллагена, повышение эластичности, усиление перфузии тканей и увеличение васкуляризации тканей, усиление пролиферации клеток, особенно фибробластов, что в целом приводит к восстановлению поврежденных тканей [3].

У пациентов на фоне применения ФБМТ показатели ВСР имели значимо меньшую общую мощность, по сравнению с пациентами без лазерной терапии. Так, ультранизкочастотный компонент, который часто ассоциируют с циркадианными ритмами [9]. Повышение мощности ULF свидетельствует о сбое циркадианных ритмов в результате хирургической травмы на фоне воспалительных явлений в группе без применения НИЛТ. HF показывает тонус парасимпатической нервной системы в то время, как LF, по



**Рис. 2.** Изменения показателей частотной области вариабельности сердечного ритма с применением ФБМГ после септопластики и без нее: а – ULF, б – LF, в – HF, г – общая мощность.



**Рис. 3.** Интенсивность болевого синдрома после септопластики. \* – достоверные различия между группами при  $p < 0.001$ .

мнению (Celiker M. и др), может отражать и симпатический (преимущественно), и парасимпатический тонус [10]. Снижение LF и HF после септопластики с применением НИЛТ отражает снижение симпатического и парасимпатического тонуса после септопластики. Смещение баланса ВНС в сторону ее симпатического компонента является физиологически обоснованным и соответствует степени выраженности воздействия

стрессовых факторов. Однако увеличение тонуса парасимпатической нервной системы в условиях стресса может говорить о неадекватном ответе организма и соответствовать [11], что может отражать степень хирургического повреждения в челюстно-лицевой области [12]. Так, было показано, что после септопластики LF ВСП может резко снижаться [11]. В нашем исследовании у группы пациентов с классическим вариантом постопера-

ционной реабилитации была повышена активность и симпатического, и парасимпатического отделов ВНС. Исследования показали взаимосвязь между реологией крови, когнитивными функциями [13] и улучшением настроения [14]. Было высказано предположение, что системные эффекты НИЛТ после облучения крови также могут в конечном итоге оказывать нейропротекторное действие [15, 16]. Также известно, что интраназальное облучение крови имеет такие же неврологические последствия, что и внутривенная или внутрисосудистая НИЛТ [17]. Данные факты также объясняют более низкий болевой синдром, меньшие изменения в балансе ВНС в ответ на хирургическое повреждение после септопластики у пациентов с применением НИЛТ в раннем послеоперационном периоде.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в нашем исследовании группа пациентов с НИЛТ показала лучшие результаты по болевому синдрому и ВСР, т.е. меньшее развитие стрессовых реакций, по сравнению с классической реабилитацией пациентов после септопластики.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kastyro I.V., Inozemtsev A.N., Shmaevsky P.E., Khamidullin G.V., Torshin V.I., Kovalenko A.N., Pryanikov P.D., Guseinov I.I.* The impact of trauma of the mucous membrane of the nasal septum in rats on behavioral responses and changes in the balance of the autonomic nervous system (pilot study) // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2020; V. 1611: P. 012054.
2. *Popadyuk V.I., Kastyro I.V., Ermakova N.V., Torshin V.I.* Septoplasty and tonsillectomy: acute stress response as a measure of effectiveness of local anesthetics. // *Vestn Otorinolaringol.* 2016; V. 81. № 3. P. 7–11.
3. *Karimi S., Sadeghi M., Amali A., Saedi B.* Effect of Photobiomodulation on Ecchymosis after Rhinoplasty: A Randomized Single-Blind Controlled Trial. // *Aesthetic Plast Surg.* 2020. V. 44. № 5. P. 1685–1691.
4. *Suchonwanit P., Chalermroj N., Khunkhet S.* Low-level laser therapy for the treatment of androgenetic alopecia in Thai men and women: a 24-week, randomized, double-blind, sham device-controlled trial. // *Lasers Med Sci.* 2018. V. 2018. P. 1–8.
5. *Zein R., Selting W., Hamblin M.R.* Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. // *J. Biomed. Opt.* 2018. V. 23. P. 120901.
6. *Santos F.T., Santos R.S., P.L., Weckwerth V., Dela Coleta Pizzol K.E., Pereira Queiroz T.* Is low-level laser therapy effective on sensorineural recovery after bilateral sagittal split osteotomy? Randomized trial. // *J Oral Maxillofac Surg.* 2019. V. 77. № 1. P. 164–173.
7. *Naik K.* A Novel Way of Trans-Septal Splint Suturing Without Nasal Packing for Septoplasty. // *Indian J. Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015. V. 67. № 1. P. 48–50.
8. *Kazemikhoo N., Vaghardoost R., Dahmardehei M., Mokmeli S., Momeni M., Nilfroushzadeh M.A., Ansari F., Razagi M.R., Razagi Z., Amirkhani M.A., Masjedi M.R.* Evaluation of the effects of low level laser therapy on the healing process after skin graft surgery in burned patients (a randomized clinical trial). // *J. Lasers Med Sci.* 2018. V. 9. № 2. P. 139.
9. *Bersani I., Piersigilli F., Gazzolo D., Campi F., Savarese I., Dotta A., Tamborrino P.P., Auriti C., Di Mambro C.* Heart rate variability as possible marker of brain damage in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a systematic review. // *European Journal of Pediatrics.* 2020. V. 27. P. 1–11.
10. *Celiker M., Cicek Y., Tezi S., Ozgur A., Polat H.B., Dursun E.* Effect of Septoplasty on the Heart Rate Variability in Patients With Nasal Septum Deviation. // *J Craniofac Surg.* 2018. V. 29. № 2. P. 445–448.
11. *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.
12. *Dolgalev A.I., Svyatoslavov D.S., Pout V.A., Reshetov I.V., Kastyro I.V.* Effectiveness of the Sequential Use of Plastic and Titanium Implants for Experimental Replacement of the Mandibular Defect in Animals using Preliminary Digital Design. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2021. V. 496. P. 36–39.
13. *Elwood P.C., Pickering J., Gallacher J.E.* Cognitive function and blood rheology: results from the Caerphilly cohort of older men. // *Age Ageing.* 2001. V. 30. P. 135–139.
14. *Gao Z.-S., Zhang L., Qin C.-I.* The relationship between hemorheological changes and the anxiety and depression symptoms in schizophrenia. // *Chin. J. Hemorheol.* 2004. V. 1.
15. *Xiao X., Guo Y., Chu X., Jia S., Zheng X., Zhou C.* Effects of low power laser irradiation in nasal cavity on cerebral blood flow perfusion of patients with brain infarction. // *Chin. J. Phys. Med.* 2005. V. 27. P. 418–420.
16. *Caldieraro M.A., Sani G., Bui E., Cassano P.* Long-term near-infrared photobiomodulation for anxious depression complicated by Takotsubo cardiomyopathy. // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2018. V. 38. P. 268–270.
17. *Dou Z., Xiquan H., Zhu H.* The effects of two kinds of laser irradiation on patients with brain lesion. // *Chin. J. Phys. Med. Rehabil.* 2003. V. 2. P. 38–43.

## LOW-INTENSITY LASER THERAPY AS A METHOD TO REDUCE STRESS RESPONSES AFTER SEPTOPLASTY

**I. V. Kastyro<sup>a, #</sup>, V. I. Popadyuk<sup>a</sup>, G. M. Muradov<sup>a</sup>,  
and academician of the RAS I. V. Reshetov<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

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

The aim of the study was to evaluate the effectiveness of the use of photobiomodulation therapy (PBMT) to minimize acute pain in the early postoperative period in patients after septoplasty. 62 patients underwent septoplasty under general anesthesia (40 men and 22 women, 18–44 y.o.) followed by nasal tamponade. Patients of the 1st group did not undergo PBMT, and patients of the 2nd group – PBMT after 3 hours, 6 hours and 24 hours after septoplasty (infrared pulsed laser radiation,  $\lambda$  0.890  $\mu\text{m}$ , P 10 W, 2 minutes in the projection of the wings of the nose). After 48 hours, after removing the tampons, intranasal PBMT with a nozzle in the red range, with  $\lambda$  0.63  $\mu\text{m}$ , P 8 mW, 2 minutes. ULF, HF, LF and total power of heart rate variability (HRV), pain syndrome was assessed. ULF, LF, HF, total HRV power were significantly lower in group 2, compared to group 1. In the period from 6 to 24 hours after septoplasty, patients of group 1 experienced higher pain than patients with BMT ( $p < 0.001$ ). The use of PBMT after septoplasty against the background of nasal tamponade helps to reduce the severity of pain syndrome, to reduce the inflammatory response to surgical stress, and, consequently, to less pronounced changes in the autonomic nervous system in response to surgical stress.

*Keywords:* septoplasty, pain, photobiomodulation, heart rate variability

УДК 575.22:595.773.4

## Sfmbt ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С БЕЛКОМ Hangover И СУБЪЕДИНИЦАМИ SWI/SNF-КОМПЛЕКСА У *Drosophila melanogaster*

© 2021 г. М. М. Ерохин<sup>1</sup>, Ю. В. Шидловский<sup>1</sup>, Д. В. Ломаев<sup>1</sup>,  
академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, Д. А. Четверина<sup>1,\*</sup>

Поступило 23.04.2021 г.

После доработки 06.05.2021 г.

Принято к публикации 06.05.2021 г.

Белки группы Polycomb (PcG) представлены регуляторными комплексами, осуществляющими репрессию транскрипции. В настоящем исследовании методом аффинной очистки из ядерного экстракта с последующим высокоспецифичным пептидным секвенированием (IP/LC-MS) мы изучили интерактом фактора Sfmbt на эмбриональной стадии развития дрозофилы. В результате был обнаружен ряд ранее не охарактеризованных взаимодействий Sfmbt. В частности, основными партнерами Sfmbt являются ДНК-связывающий белок Hangover, а также компоненты SWI/SNF-комплекса ремоделеров хроматина.

*Ключевые слова:* *Drosophila*, Polycomb, PRE-элемент, репрессия транскрипции, SWI/SNF, Hangover

**DOI:** 10.31857/S2686738921050097

Репрессия транскрипции – сложно регулируемый процесс, который осуществляется многими факторами, в частности белками из группы Polycomb (PcG) [1–5]. Нарушения активности данных факторов наблюдаются при многих патологических состояниях, что повышает интерес к исследованиям в этой области [6–9]. PcG формируют несколько белковых комплексов (PRC1, PRC2, PhoRC), которые рекрутируются на специфические области хроматина, называемые Polycomb response elements (PREs). Комплекс PhoRC (Pho repressive complex), охарактеризованный у дрозофилы, содержит белок Sfmbt, а также ДНК-связывающий фактор Pho или его гомолог Phol. Несмотря на данные, согласно которым Pho/Phol необходимы для привлечения Sfmbt на хроматин, около 50% геномных областей, с которыми взаимодействует Sfmbt, не демонстрируют связывания Pho/Phol [10]. Таким образом, предполагается, что на ряд PRE-элементов Sfmbt рекрутируется за счет других ДНК-связывающих белков.

### *Структура Sfmbt и получение специфичных поликлональных антител*

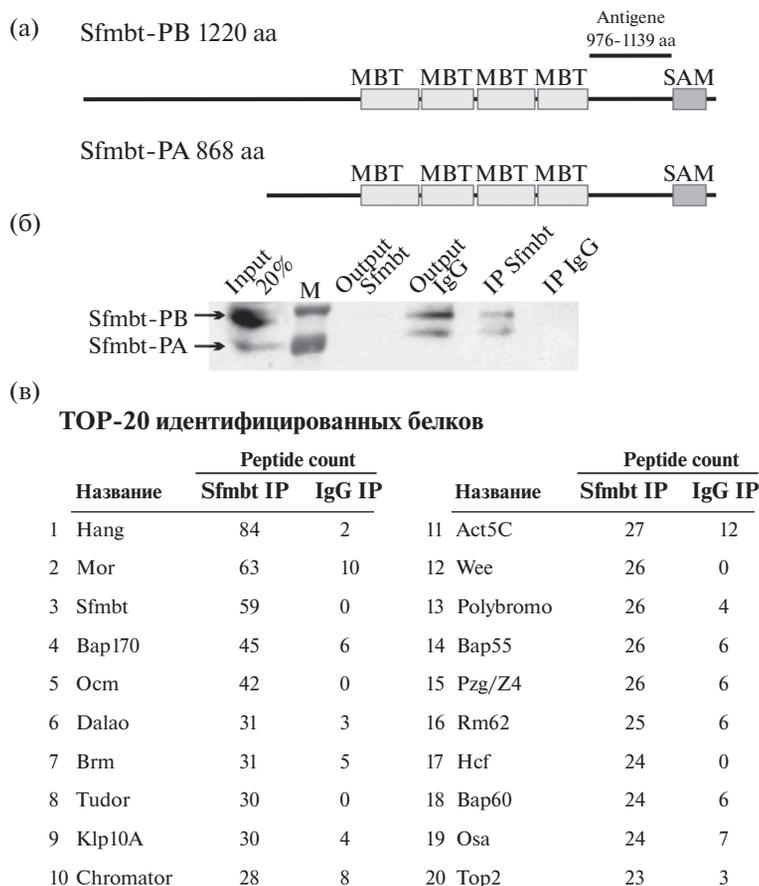
Белок Sfmbt имеет две основные изоформы длиной 1220 а.о. (изоформа Sfmbt-PB) и 868 а.о.

(изоформа Sfmbt-PA, рис. 1а). Обе изоформы содержат четыре MBT-повтора в середине белка (536–975 а.о. относительно изоформы B) и SAM-домен на С-конце (1140–1203 а.о. относительно изоформы B), однако изоформа Sfmbt-PA лишена N-концевого домена, имеющегося у Sfmbt-PB. Домен, содержащий четыре MBT-повтора, необходим для взаимодействия с ДНК-связывающими белками Pho и Phol, тогда как SAM-домен образует контакты с другим PcG-фактором – Scm [11].

Для получения поликлональных антител была создана конструкция для наработки антигена, соответствующего фрагменту С-конца белка Sfmbt (976–1139 а.о. изоформы B, рис. 1а). Данная область была выбрана в качестве антигена исходя из двух соображений. Во-первых, использованный участок присутствует в обеих изоформах Sfmbt. Таким образом, антитела, полученные к данной области, будут детектировать оба варианта белка Sfmbt. Во-вторых, участок между MBT-повторами и SAM-доменом уникален для Sfmbt и не содержит гомологий с другими белками. Полученная конструкция для наработки антигена была создана на основе вектора pET32a (Novagene) и содержала слитые в одну рамку считывания с фрагментом Sfmbt два шестикратных гистидиновых тага (6xHisTag, на N- и С-концах фрагмента Sfmbt), необходимые для последующей очистки антигена.

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

\*e-mail: daria.chetverina@gmail.com



**Рис. 1.** (а) Структура белка Sfmibt у *Drosophila melanogaster* (показаны изоформы Sfmibt PB и PA). Серые прямоугольники – MBT-повторы, темно-серый прямоугольник – SAM-домен. Обозначенная область 976-1139 а.о. была использована в качестве антигена. (б) Результаты Western-блот-гибридизации, полученные при анализе алиquot очищенного комплекса Sfmibt. Стрелками указаны полосы, соответствующие изоформам PB и PA. Output – ядерный экстракт после инкубации с антителами против Sfmibt, либо против неспецифических антител (IgG). IP – элюированные пробы, полученные после инкубации с антителами против Sfmibt, либо против неспецифических антител (IgG). M – маркер длин, полосы соответствуют размерам 100 и 130 кДа. (в) 20 наиболее представленных белковых партнеров Sfmibt, идентифицированных в протеомном анализе. Показано число пептидов (peptide count) в случае иммунопреципитации с антителами против Sfmibt (столбец Sfmibt IP) и в случае использования неспецифических иммуноглобулинов (столбец IgG IP).

После наработки (в клетках *E. coli* BL21) и очистки (использована Ni Sepharose 6 Fast Flow, Sigma) антигена были проведены процедуры по иммунизации кроликов. Полученную сыворотку очищали с использованием исходного антигена, ковалентно пришитого к сефарозе CL-4B. Очищенные поликлональные антитела применяли для выделения белкового комплекса.

#### Очистка и анализ белкового комплекса Sfmibt

Для выявления белковых партнеров Sfmibt был применен метод иммунопреципитации из ядерного эмбрионального экстракта (возраст эмбрионов – 1–12 ч) с использованием полученных антител. Методы выделения ядерного экстракта и иммунопреципитации были подробно описаны ранее [12, 13].

На рис. 1б показаны результаты вестерн-блот анализа, проведенного с использованием алиquotы материала, который в дальнейшем был проанализирован методом пептидного секвенирования LC-MS. Для окрашивания были использованы те же антитела, что и для иммунопреципитации. В элюате, полученном с использованием специфических антител, детектируются две полосы, соответствующие по молекулярным массам изоформам Sfmibt-PB и Sfmibt-PA (расчетные массы 134 и 96 кДа соответственно). При этом данные полосы отсутствуют в контрольном эксперименте, где в качестве неспецифических антител были использованы IgG неиммунизированного животного. Вместе с тем анализ экстракта после инкубации с антителами (Output) показывает истощение Sfmibt в случае использования специфических антител в сравнении с контрольными IgG.

(a)			(б)			(в)		
Субъединицы комплексов семейства SWI/SNF			Канонические комплексы Polycomb			Белки с мотивом ZnF C2H2-type		
Название	Peptide count		Название	Peptide count		Название	Peptide count	
	Sfmbt IP	IgG IP		Sfmbt IP	IgG IP		Sfmbt IP	IgG IP
Mor	63	10	Комплекс Pho RC			Hang	84	2
Dalao	31	3	Sfmbt	59	0	Pzg/Z4	26	6
Brm	31	5	Pho	0	0	Pep	12	0
Act5C	27	12	PhoI	0	0	Cg (Combgap)	10	2
Var55	26	6	Комплекс PRC1			CG8108	10	2
Var60	24	6	Sce/dRing	2	0	MEP-1	9	0
Субъединицы, специфичные для комплекса PVAR			Ph-p	0	0			
Var170	45	6	Ph-d	0	0			
Polybromo	26	4	Pc	0	0			
SAYP	9	0	Psc	0	0			
Субъединицы, специфичные для комплекса VAR			Комплекс PRC2					
Osa	24	7	E(z)	4	0			
			Esc	4	0			
			Su(z)12	0	0			
			CafI-55	7	0			

**Рис. 2.** Sfmbt взаимодействует с ремоделерами хроматина и ДНК-связывающими факторами. Представлены результаты протеомного анализа для компонентов хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF (а), PcG-репрессоров (б) и белков с ДНК-связывающими мотивами типа “цинковые пальцы” C2H2-типа (в). Остальные обозначения как на рис. 1.

На следующем этапе выделенный материал анализировали методом масс-спектрометрии LC-MS, позволяющим идентифицировать все представленные в иммунопреципитате пептиды. Анализ проводился, как подробно описано ранее [13], для идентификации пептидов использованы базы данных UniProt *Drosophila melanogaster* и DTASelect. На рис. 1в показаны 20 идентифицированных белков, показавших наибольший уровень обогащения при проведении масс-спектрометрических исследований. Для белка Sfmbt было выявлено 59 пептидов против 0 пептидов в контрольном образце с неспецифическими антителами. Это подтверждает высокую специфичность проведенной очистки. Среди основных партнеров Sfmbt выделяются субъединицы комплексов ремоделеров хроматина семейства SWI/SNF. Детальный поиск субъединиц ремоделеров показал, что в иммунопреципитате присутствуют все компоненты комплексов VAR и PVAR (рис. 2а).

На следующем этапе мы проверили, какие еще белки из группы Polycomb детектируются в интрактом Sfmbt (рис. 2б).

Были найдены два белка, входящих в состав комплекса PRC2 (E(z) и Caf55), и один белок из комплекса PRC1 (Sce/dRING). Интересно, что ни белок Pho, ни белок PhoI, не детектировались в выделенном комплексе. Полученные данные

предполагают, что использованные нами антитела преципитируют Sfmbt в составе отличного от описанного ранее PhoRC комплекса. В данном комплексе также могут находиться компоненты с ДНК-связывающей активностью, необходимые для рекрутирования Sfmbt на хроматин. Предполагается, что основную роль в привлечении PcG-комплексов у дрозофилы играют белки с мотивами “цинковые пальцы” C2H2-типа [14]. Поэтому на следующем этапе мы провели поиск таких факторов в списке идентифицированных белков (рис. 2в). Самое большое число пептидов (84) соответствовало белку Hang (Hangover). Данный фактор содержит в своем составе 19 мотивов типа “цинковые пальцы” C2H2-типа. Кроме того, среди обнаруженных белков присутствовал фактор Combgap (Cg), для которого ранее были показаны связывание с PRE-элементами и взаимодействие с PcG-репрессорами [15].

Идентифицированные ДНК-связывающие белки потенциально могут принимать участие в привлечении Sfmbt в определенные локусы генома, однако конкретную роль выявленных факторов в процессах рекрутирования Sfmbt (как и, возможно, других PcG-репрессоров) предстоит установить в будущем.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-74-10091.

В работе была использована инфраструктура ЦКП ИБГ РАН и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chetverina D.A., Elizar'ev P.V., Lomaev D.V., et al. // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. № 2. P. 157–177.
2. Schuettengruber B., Bourbon H.M., Di Croce L., et al. // Cell. 2017. V. 171. № 1. P. 34–57.
3. Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W. // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725.
4. Cheutin T., Cavalli G. // Crit Rev Biochem Mol Biol. 2019 V. 54 № 5. P. 399–417.
5. Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. // Annu. Rev. Biochem. 2020. V. 89. P. 235–253.
6. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Erokhin M.M. // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 4. P. 66–85.
7. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Georgiev P. G., et al. // Russian Journal of Genetics. 2021. V. 57. № 3. P. 258–272.
8. Varlet E., Ovejero S., Martinez A.M., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21 № 21. P. 8047.
9. Piunti A., Shilatjard A. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2021.
10. Oktaba K., Gutiérrez L., Gagneur J., et al., // Dev Cell. 2008 V. 15. № 6. P. 877–889.
11. Frey F., Sheahan T., Finkl K., et al., // Genes Dev. 2016. V. 30 № 9. P. 1116–1127.
12. Shaposhnikov A.V., Lebedeva L.A., Chernioglo E.S., et al. // Bioorg Khim. 2016. V. 42. P. 712–721.
13. Lomaev D., Mikhailova A., Erokhin M., et al. // PLoS ONE. 2017. V. 12. e0173602.
14. Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1–24.
15. Ray P., De S., Mitra A., et al., // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831.

## Sfmbt CO-PURIFIES WITH HANGOVER AND SWI/SNF-REMODELERS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

M. M. Erokhin<sup>a</sup>, Y. V. Shidlovskii<sup>a</sup>, D. V. Lomaev<sup>a</sup>,  
Academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>a</sup>, and D. A. Chetverina<sup>a,\*</sup>

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

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

Polycomb group (PcG) proteins are chromatin-associated factors involved in the repression of gene transcription. In the present study, we characterized the interactome of the Sfmbt factor at the embryonic stage of development. For this the Sfmbt protein complex was affinity purified from the nuclear extract and followed by highly specific peptide sequencing (IP/LC-MS). As a result, a number of previously uncharacterized Sfmbt interactions were discovered. In particular, Sfmbt Top-interacting proteins include DNA-binding protein Hangover and components of the SWI/SNF family of chromatin remodelers.

**Keywords:** *Drosophila*, Polycomb, PRE-element, repression of transcription, SWI/SNF, Hangover

УДК 615.332, 577.181.5

## ИНГИБИРОВАНИЕ ОНКОГЕНА *c*-МУС АНТИБИОТИКАМИ-ПРОИЗВОДНЫМИ АУРЕОЛОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2021 г. А. К. Исагулиева<sup>1,2,\*</sup>, Н. В. Сошникова<sup>1</sup>, А. А. Штиль<sup>3</sup>

Представлено академиком РАН П.Г. Георгиевым

Поступило 27.04.2021 г.

После доработки 06.05.2021 г.

Принято к публикации 07.05.2021 г.

Внутриклеточные мишени антибиотиков-производных ауреоловой кислоты — оливомицин А и его полусинтетического производного оливамида — GC-богатые участки в малой бороздке ДНК. Нами установлено, что оба соединения в наномолярных концентрациях ингибируют транскрипцию онкогена *c*-Мус в опухолевых клетках человека. Механизм ингибирования не требует взаимодействия антибиотиков с полноразмерным сайтом связывания GC-специфического транскрипционного фактора Sp1, а обусловлен присутствием GC-квartetов с оптимальной константой комплексообразования.

**Ключевые слова:** противоопухолевые антибиотики, оливомицин А, онкоген *c*-Мус, транскрипция, низкомолекулярные химические соединения

**DOI:** 10.31857/S2686738921050152

Оливомицин А (**I**; рис. 1) и другие антибиотико-производные ауреоловой кислоты активно исследовались и некоторое время применялись в качестве противоопухолевых агентов. Мишень этих соединений — малая бороздка ДНК [1, 2]. Образование стабильного комплекса **I** с мишенью приводит к ингибированию транскрипции и репликации; гибель опухолевых клеток достигается в наномолярных концентрациях [3]. Общерезорбтивная токсичность ограничивает клиническое использование столь активного природного соединения. Требуется исследование молекулярных механизмов действия **I** для создания его эффективных и менее токсичных аналогов.

Предпочтительные сайты связывания **I** содержат GC-квartetы; наибольшую константу связывания обеспечивают центральные динуклеотиды

5'-GG-3' или 5'-GC-3' [4]. Подобные последовательности часто встречаются в регуляторных областях генов и могут полностью или частично перекрываться участками узнавания транскрипционных факторов (ТФ), например, Sp1. Аффинность к ДНК и выраженная GC-специфичность объясняют способность **I** и других соединений этого класса ингибировать транскрипцию генов. Детальное изучение комплексов с ДНК позволило создать полусинтетический аналог **I** — оливаמיד (**II**; рис.1) с уменьшенной константой комплексообразования, терапевтической активностью и переносимостью в моделях *in vivo* [5].

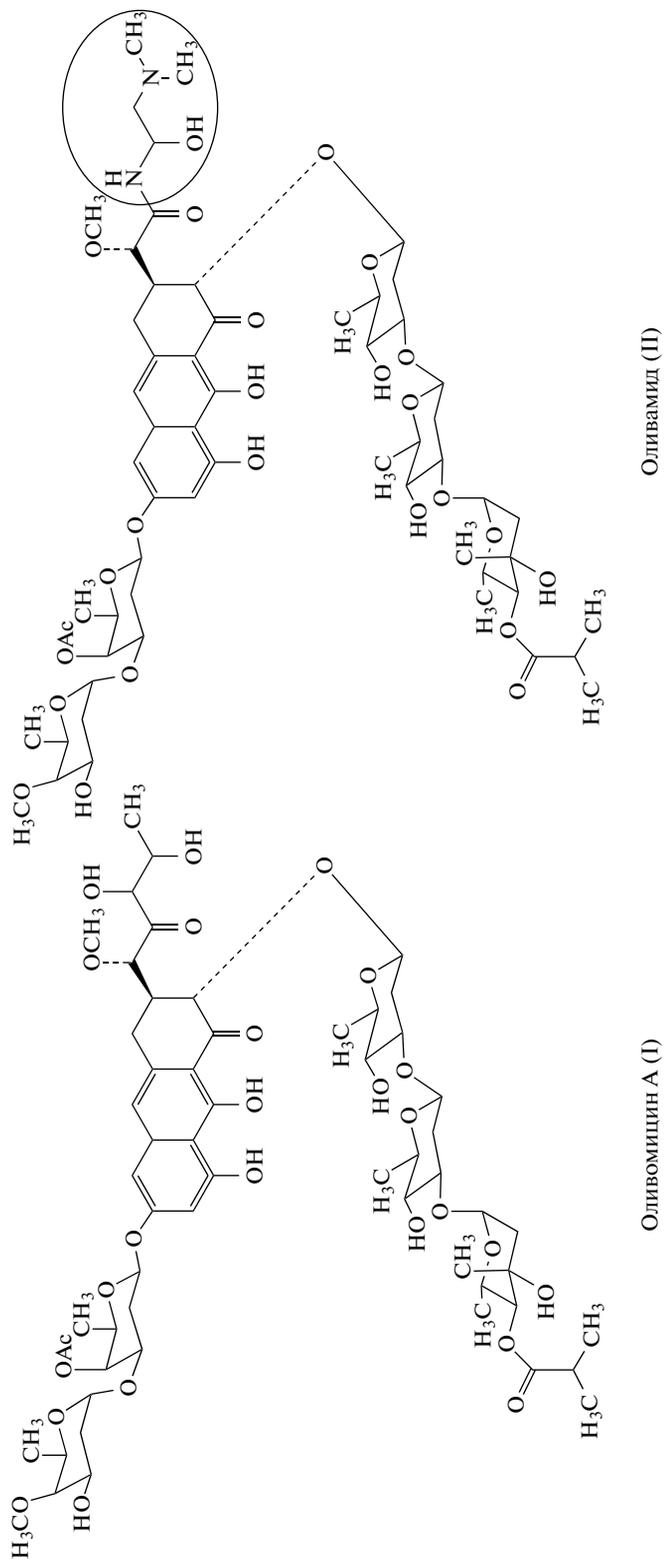
Антибиотик **I** подавляет экспрессию *c*-Мус — онкогена [6, 7], экспрессированного во многих опухолях [8]. Существенная часть транскрибируемого участка гена *c*-Мус, а также его 5'-UTR область представлены CpG-богатыми участками и содержат GC-консенсусы, с которыми способны связываться **I** и **II** [9]. Промоторы P0-P3 гена *c*-Мус также содержат GC-богатые области. Правомерно предположить, что подавление транскрипции *c*-Мус может происходить из-за связывания **I** и **II** с регуляторными участками гена или с сайтами связывания ТФ. Взаимодействуют ли **I** и **II** только с определенными регуляторными областями, в частности, с консенсусными участками для GC-зависимых ТФ, или и с другими GC-участками?

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

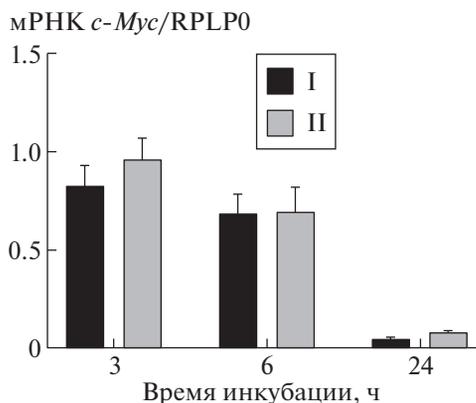
<sup>2</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

\*e-mail: kia2303@ya.ru



**Рис. 1.** Формулы оливомицина А (I) и его полусинтетического аналога оливамида (II).



**Рис. 2.** Уровень мРНК *c-Myc* в клетках НСТ116 после инкубации с соединениями **I** и **II** (100 нМ) в течение 3–24 ч. Уровень мРНК *c-Myc* в необработанных клетках принят за 1. Представлены средние величины и стандартные отклонения по результатам трех экспериментов.

В настоящей работе ингибирование *c-Myc* соединениями **I** и **II** исследовали на культивируемых опухолевых клетках человека: родительской линии НСТ116 (аденокарцинома кишки) и сублиниях НСТ116TRE-CMV-Fl-cMyc и А375-TRE-CMV-Fl-cMyc (меланома) с соответствующими индуцибельными генетическими конструкциями.

Относительное содержание мРНК эндогенного *c-Myc* определяли на клетках НСТ116. После добавления **I** или **II** (100 нМ) клетки НСТ116 инкубировали в течение 3–24 ч и оценивали уровень мРНК *c-Myc* с помощью количественной ПЦР после обратной транскрипции. Интенсивность сигналов рассчитывали относительно уровня мРНК гена *RPLP0*. Соединения **I** и **II** после 6 ч инкубации снижали количество мРНК *c-Myc* на ~25% по сравнению с интактными клетками (рис. 2); к 24 ч транскрипты *c-Myc* почти не определялись.

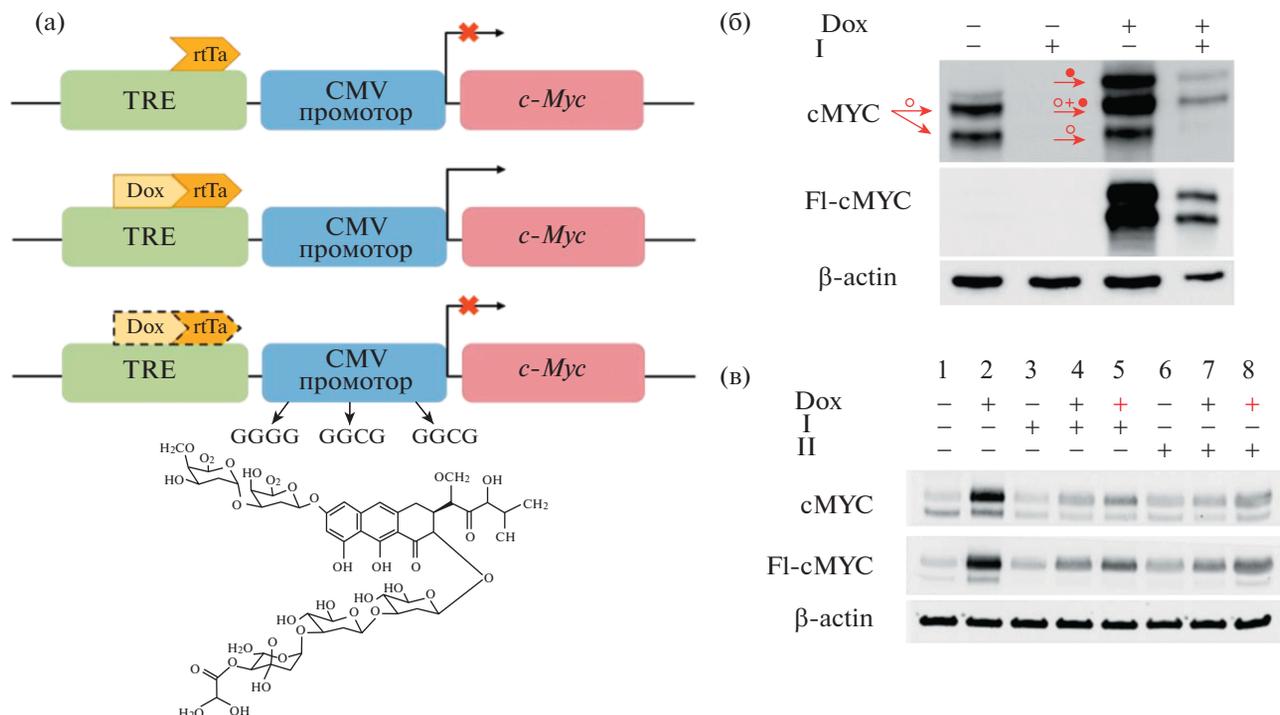
Известно, что производные ауреоловой кислоты ингибируют транскрипцию Sp1-зависимых генов [10]. Консенсусный участок связывания ТФ Sp1 (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) содержит GC-участки – вероятные сайты связывания **I**. Показано, что производные ауреоловой кислоты специфичны именно для Sp1-зависимых промоторов [10, 11]. Однако экспрессия самого Sp1 также ингибируется производными ауреоловой кислоты [11, 12]; 5'-нетранслируемый район и область старта транскрипции этого гена содержат большое число CpG-островков. Для решения вопроса о том, обязательно ли мишень **I** и **II** должна включать сайт взаимодействия указанного ТФ, получена сублиния клеток НСТ116-TRE-CMV-Fl-cMyc с возможностью индукции экзогенного *c-Myc* доксициклином (Dox). Генетическая кон-

струкция, использованная для получения сублинии, включала последовательность TRE-CMV, не имеющую GC-участков связывания Sp1 (рис. 3а, верхняя и средняя панели).

Принцип функционирования индуцибельной системы Tet-On: в отсутствие Dox элемент rTA блокирует инициацию транскрипции (верхняя панель); Dox связывает элемент rTA, активируя транскрипцию (средняя панель). Связывание **I** или **II** с GC-участками возможно только в CMV-промоторе (нижняя панель), поэтому действие антибиотиков на экспрессию репортерного гена *c-Myc* обусловлено их комплексобразованием только с этими участками.

Экспрессию рекомбинантного белка Fl-cMyc активировали добавлением Dox (рис. 3б). Соединение **I** (100 нМ, 24 ч) полностью подавляло экспрессию эндогенного *c-Myc*. В комбинации с Dox **I** ингибировал и эндогенный белок *c-Myc*, и экзогенную форму, активируемую Dox. Схожие эффекты наблюдали при добавлении **I** и **II** к клеткам сублинии А375-TRE-CMV-Fl-cMyc (конструкция Fl-cMyc под контролем Tet-On элемента и CMV-промотора; рис. 3в). Соединения **I** и **II** оказывали выраженный ингибирующий эффект на обе формы белка *cMyc* (рис. 3в, дорожки 3, 4 и 6, 7 по сравнению с контролями). Если клетки предварительно инкубировали 1 ч с Dox, подавление *cMyc* было менее выраженным (рис. 3в, дорожки 5 и 8). Сравнивая эффективность **I** и **II** для разных линий клеток, можно предположить, что степень ингибирования эндогенного и экзогенного *cMyc* может быть тканеспецифичной и определяться молекулярным окружением генов-мишеней и отдельных сайтов связывания **I** и **II**.

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что для связывания с ДНК и ингибирования транскрипции производными ауреоловой кислоты наличие полноразмерного сайта связывания Sp1 не обязательно. Определяющим для формирования комплекса с ДНК и, следовательно, ингибирования транскрипции являются предпочтительные для **I** или **II** GC-участки. Таким образом, производные ауреоловой кислоты ингибируют транскрипцию не сайт-специфическим, а сиквенс-специфическим образом. Для **I** нуклеотидные последовательности в GC-квартетах, предпочтительные для формирования стабильных комплексов, установлены [4]; требуется выявить закономерности предпочтения для **II**. Важно, что активность **II** как ингибитора онкогена *c-Myc* почти не уступает **I**. Наряду со способностью вызывать гибель опухолевых клеток разного тканевого происхождения и приемлемыми характеристиками *in vivo* [5], оливамид **II** приобретает значение противоопухолевого лекарственного “кандидата”.



**Рис. 3.** Ингибирование активации *c-Myc* под действием **I** и **II**.

а – Схема фрагмента плазмидной конструкции TRE-CMV-FI-cMyc и экспрессии FI-cMyc при добавлении **I** (100 нМ) и Dox (1 мкг/мл); б – иммуноблоттинг лизатов клеток HCT116-TRE-CMV-FI-cMYC при добавлении **I** и доксициклина (Dox), стрелками обозначены эндогенная (o) и экзогенная (\*) формы белка cMyc; в – иммуноблоттинг лизатов клеток A375-TRE-CMV-FI-cMyc при действии Dox, **I** и **II**: в дорожках 4 и 7 вначале добавляли **I/II**, через 1 ч вносили Dox; в дорожках 5 и 8 – обратный порядок добавления модуляторов. Бета-актин использовали для нормализации – контроля внесения белков в полиакриламидный гель.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90064.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брикентштейн В.Х., Путина Л.Р., Баренбойм Г.М., и др. Стереохимия и кинетика взаимодействия с ДНК противоопухолевого антибиотика оливомицина // Мол. биология. 1984. Т. 18, № 4. С. 1606–1616.
2. Lombó F., Menéndez N., Salas J.A., et al. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives // Applied Microbiology and Biotechnology. 2006. V. 73. № 1. P. 1–14.
3. Sabín J.G., Morís F. Exploring Novel Opportunities for Aureolic Acids as Anticancer Drugs // Biochemistry & Pharmacology: Open Access. 2013. V. 2. № 1. P. 1–3.
4. Beniaminov A.D., Chashchina G.V., Livshits M.A., et al. Discrimination between G/C Binding Sites by Olivomycin A Is Determined by Kinetics of the Drug-DNA Interaction // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. № 15. P. 5299.
5. Teyvashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N., et al. Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2011. V. 19. № 24. P. 7387–7393.
6. Самусенко А.В. Механизмы гибели клеток при действии оливомицина и его производных: Дисс. канд. мед. наук. Москва; 2009.
7. Isagulieva A.K., Beniaminov A.D., Tatarskiy V.V., et al. Targeting gene transcription: mechanisms of antitumor potency of Olivomycin A and its preclinical derivative [letter] // FEBS Open Bio. 2019. V. 9. S1. P. 153.
8. Vita M., Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer // Seminars in Cancer Biology. 2006. V. 16. № 4. P. 318–330.
9. Mognol G.P., de Araujo-Souza P.S., Robbs B.K., et al. Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements // Cell Cycle. 2012. V. 11. № 5. P. 1014–1028.
10. Previdi S., Malek A., Albertini V., et al. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and

- SK in human ovarian cancer xenografts // *Gynecologic Oncology*. 2010. V. 118. № 2. P. 182–188.
11. *Sleiman S.F., Langley B.C., Basso M., et al.* Mithramycin Is a Gene-Selective Sp1 Inhibitor That Identifies a Biological Intersection between Cancer and Neurodegeneration // *Journal of Neuroscience*. 2011. V. 31. № 18. P. 6858–6870.
12. *Choi E.-S., Nam J.-S., Jung J.-Y., et al.* Modulation of specificity protein 1 by mithramycin A as a novel therapeutic strategy for cervical cancer // *Scientific Report*. 2014. V. 4. № 1. P. 1–8.

## INHIBITION OF THE *c-Myc* ONCOGENE BY THE AUREOLIC ACID GROUP ANTIBIOTICS

A. K. Isagulieva<sup>a,b,#</sup>, N. V. Soshnikova<sup>a</sup>, and A. A. Shtil<sup>c</sup>

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

<sup>b</sup> *Federal State Budgetary Scientific Institution Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup> *Federal State Budgetary Scientific Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: kia2303@ya.ru*

Presented by academician of the RAS P.G. Georgiev

GC-rich stretches in the DNA minor groove are the established intracellular targets for the aureolic acid group of antibiotics such as olivomycin A and its semi-synthetic analogue olivamide. We demonstrated here that both antibiotics at nanomolar concentrations inhibited transcription of the *c-Myc* oncogene in cultured human tumor cells. The mechanism of transcriptional inhibition did not require the full length binding site for Sp1, a GC-dependent transcriptional factor. GC quartets with the nucleotide sequences optimal for drug binding are sufficient for *c-Myc* transcriptional block by the aureolic acid derivatives.

*Keywords:* antitumor antibiotics, olivomycin A, *c-Myc* oncogene, transcription, low molecular weight chemical compounds

УДК 581.1

## ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ, СВЕТОВАЯ И ЦИРКАДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PAP* БЕЛКОВ ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН *ARABIDOPSIS THALIANA*

© 2021 г. А. А. Андреева<sup>1</sup>, Н. В. Кудрякова<sup>1,\*</sup>,  
член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов<sup>1</sup>, В. В. Кузнецов<sup>1</sup>

Поступило 23.04.2021 г.

После доработки 22.05.2021 г.

Принято к публикации 23.05.2021 г.

Изучали профили экспрессии генов *PAP*, кодирующих белки, ассоциированные с пластидной мультисубъединичной РНК полимеразой, в сухих семенах, в процессе прорастания и на ранних стадиях развития проростков *Arabidopsis thaliana*. Детальный анализ уровней транскриптов *PAP* генов методом ОТ-ПЦР показал, что переход семян от состояния покоя к активному росту сопровождается резким повышением содержания транскриптов всех исследованных генов в первые сутки прорастания как на свету, так и в темноте. Дальнейшие изменения в уровнях транскриптов различались у разных *PAP* генов и, по-видимому, определялись их функциональной специфичностью. Впервые установлено, что экспрессия индивидуальных *PAP* генов регулируется наряду с факторами онтогенетической и световой природы природы циркадными ритмами.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, деэтиоляция, гены *PAP*, пластидная транскрипция, прорастание семян

**DOI:** 10.31857/S2686738921050048

### ВВЕДЕНИЕ

В основе биогенеза хлоропластов лежит координированная экспрессия ядерного и хлоропластного геномов, которая регулируется онтогенетической программой и факторами внешней среды. Ведущую роль при этом играют регуляторные белки и, прежде всего, регуляторы пластидной транскрипции. К их числу, наряду с хлоропластными РНК-полимеразами ядерного (NEP) и пластидного (PEP) кодирования и сигма факторами, относятся 12 белков, ассоциированных с PEP. Этим белкам, кодируемым ядерным геномом, отводится особая роль на начальных этапах фотоморфогенеза. Только после их присоединения к коровым субъединицам мультисубъединичной PEP образуется полноценный транскрипционный комплекс и формируются функциональные хлоропласты. Инактивация любого из этих генов приводит к блокированию программы перехода от ското- к фотоморфогенезу и появлению фенотипа *albino*, нежизнеспособного в отсутствие внешних источников углеводов [1, 2]. *PAP* белки различаются по своей структуре и функциям и

принимают участие в метаболизме нуклеиновых кислот и редокс-зависимых реакциях. *In silico* анализ транскриптомных данных позволяет предположить, что *PAP* гены образуют жестко контролируемый регулон [1], однако исследование их экспрессии на разных стадиях жизненного цикла *Arabidopsis* свидетельствовало о селективном действии света и тканеспецифичности, сочетаемой с онтогенетической изменчивостью [3].

Гены *PAP* экспрессируются уже на этапе, предшествующем формированию хлоропластов. Эти результаты были получены при анализе особенностей накопления транскриптов *PAP* при переходе от ското- к фотоморфогенезу этиолированных проростков, содержавших этиопласты [3], которые, как известно, представляют особую промежуточную фазу формирования хлоропластов. Однако для *Arabidopsis* более естественным является прорастание семян непосредственно на поверхности почвы, при котором программа скотоморфогенеза отсутствует, и эопласты семян трансформируются непосредственно в хлоропласты в тканях побега или в амилопласты в гипокотиле и корнях. При этом каждая из стадий прорастания сопровождается глубокими изменениями транскриптомных профилей, в том числе и компонентов аппарата транскрипции пластид и кодируемых ими пластидных генов [4].

<sup>1</sup> Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия  
\*e-mail: nvkudryakova@mail.ru

В представленной работе проведен детальный анализ экспрессии генов *PAP* в сухих семенах и на разных стадиях прорастания, включая стратификацию, собственно прорастание и раннее развитие проростков *A. thaliana*. При этом особый упор был сделан на сравнение накопления транскриптов *PAP* на свету и в темноте. Такой подход позволил впервые показать, что при переходе семян от состояния покоя к активному росту изменения интенсивности экспрессии генов *PAP* могли определяться не только онтогенетическими факторами и условиями освещения, но и циркадными ритмами, синхронизирующими активность компонентов аппарата транскрипции со временем суток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Семена *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia сразу после извлечения из стручков высушивали в течение 15 дней в полной темноте (сухие семена), после чего их стратифицировали в течение 48 ч при 4°C (48 ч стратификации) [4]. Далее семена проращивали в климатической камере MLR-352H-PE (Sanyo, Япония) в течение 72 ч в условиях постоянного белого света ( $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) или темноты при температуре 23°C на жидкой среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2% сахарозы, и фиксировали в жидком азоте через 1, 6, 12, 24, 48 и 72 ч.

Относительный уровень транскриптов оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) на амплификаторе LightCycler 96 ("Roche", Швейцария) с использованием готовой реакционной смеси, содержащей флуоресцентный краситель SYBR Green I (Евроген, Россия), как описано ранее [5]. Последовательности праймеров практически для всех генов приведены в работе Андреевой и соавт. [5]. Последовательности праймеров еще четырех генов, использованных в данной работе, приводятся далее: CCA1, At2g46830 (F – CAGCTCCAATATAACCGATCCAT, R – CAATTCGACCCCTCGTCAGACA), LHY, At1g01060 (F – ACGAAACAGGTAAGTGGCGACA, R – TGGGAACATCTTGAACCGCGTT), TOC1, At5g61380 (F – AATAGTAATCCAGCGCAATTTCTTTC, R – CTTCAATCTACTTTTCTTTCGGTGCT), PP2A, At3g25800 (F – ACTGCATCTAAGACAGAGTTCCA, R – CCACAAGCCCAGGACGAAT). Референсным геном служил ген регуляторной субъединицы A2 протеинфосфатазы PP2A. Все эксперименты проводили в трех биологических повторностях. На рисунках приведены средние значения и стандартные ошибки средних.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уже к концу периода стратификации экспрессия большинства генов *PAP* возрастала в полтора-два раза по сравнению с исходными значениями в сухих семенах, а через час после начала проращивания усиливалась как в темноте, так и на свету. Наиболее высокие уровни накопления транскриптов в этих точках были зафиксированы для генов *PAP5*, *6* и *10*. Варианты выявленных изменений приведены на рис. 1 на примере гена *PAP2*, который имеет наиболее типичный характер изменения уровня транскриптов, и *PAP8*, у которого уровень экспрессии снижался в процессе стратификации, что отличало его от всех других *PAP* генов. Следующие пять часов прорастания также сопровождались повышенным накоплением транскриптов всех исследованных генов при обоих световых режимах. При этом максимальные значения отмечались также для генов *PAP5*, *6*, *8* и *10*. В дальнейшем (12 и 24 ч после начала прорастания) наблюдалось замедление интенсивности экспрессии части *PAP* генов или даже ее снижение, особенно в темноте (*PAP1*, *2*, *3*, *5*, *11*). Последующая кинетика накопления транскриптов также различалась и, по-видимому, определялась функциональной специфичностью продуктов *PAP* генов. Для генов *PAP3*, *4*, *6*, *8*, *10* и *11* максимальные уровни экспрессии были зафиксированы к 48 ч, а для *PAP1*, *2*, *5*, *7*, *9* и *12* – к 72 ч. При этом после 48 ч прорастания для генов *PAP2* и *5* дальнейшее накопление транскриптов сохранялось на свету, но отсутствовало в темноте. Следует подчеркнуть, что уровень накопления транскриптов всех генов, как правило, был выше на свету. Эти данные соответствуют концепции о свето-зависимой активации генов *PAP*, необходимой для трансформации ферментативного комплекса РЕР-В, образованного коровыми субъединицами РЕР и сигма факторами, в комплекс РЕР-А и формирования полностью функциональных хлоропластов [1].

Свето-зависимая активация представляет собой лишь один из уровней регуляции экспрессии генов *PAP* при прорастании, наряду с которой их функционирование определяются онтогенетическими программами. В пользу этого предположения свидетельствует сходный характер накопления транскриптов индивидуальных генов на свету и в темноте. Заметим в этой связи, что, согласно результатам Lieber и соавт. [3], освещение индуцировало лишь слабый транзиторный рост экспрессии генов *PAP* при переходе от ското- к фотоморфогенезу. Ему предшествовало значимое накопление транскриптов *PAP* уже в темноте, позволявшее перейти к быстрому синтезу белков.

Двойной контроль онтогенетической регуляции (свето-зависимый и свето-независимый) не исчерпывает сложности механизмов активации

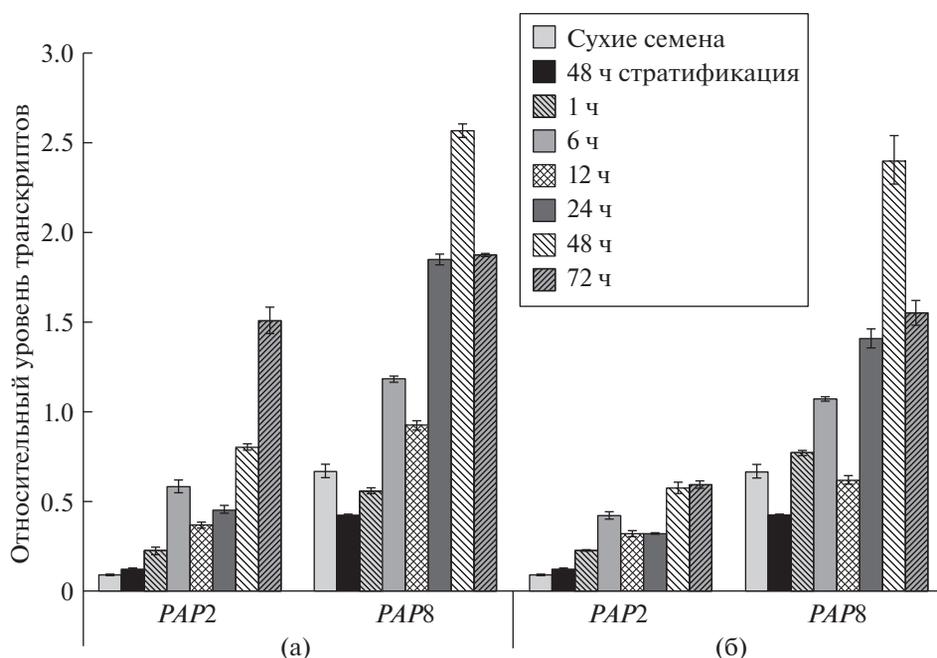


Рис. 1. Экспрессия генов *PAP2* и *PAP8* в сухих семенах, в ходе стратификации и на первых этапах роста проростков *A. thaliana* на свете (а) и в темноте (б).

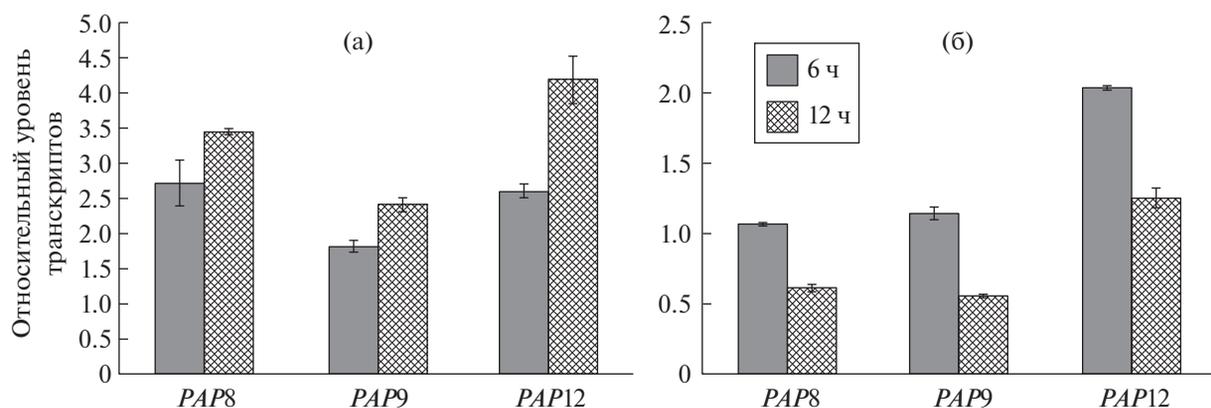


Рис. 2. Относительный уровень транскриптов избранных генов *PAP* после 6 и 12 ч прорастания в зависимости от времени начала этапа прорастания: (а) начало прорастания в 4 ч; (б) начало прорастания в 10 ч.

ции генов *PAP*. В соответствии с данными транскриптомного анализа Narsai и соавт. [4], первичные пики активности многих генов *PAP* наблюдались через 12 ч, а не через 6 ч после начала прорастания, как в наших экспериментах. Мы предположили, что эти различия, по крайней мере, для некоторых генов, связаны с действием циркадных часов, которые включаются уже на этапе замачивания семян (или даже в период их эмбрионального развития) и синхронизируют транскриптомные и метаболомные сети, обеспечивая оптимальный рост [6]. Действительно, при начале прорастания семян в 10 ч дня максимальный уровень транскриптов некоторых *PAP* генов

наступает через 6 ч, однако если прорастание семян начинается в 4 ч утра, то максимальное содержание транскриптов будет достигнуто только через 12 ч (т.е. в 16 ч дня) (рис. 2). Ранее существование суточных ритмов в накоплении транскриптов *PAP* генов было показано нами у двухнедельных проростков *Arabidopsis* [7] с наиболее выраженной амплитудой для генов *PAP3*, 5, 6, 8, 9 и 12.

Циркадные ритмы генерируются так называемым центральным осциллятором, в основе работы которого лежат транскрипционные механизмы обратной связи. У *Arabidopsis* основными компонентами центрального осциллятора являются три гена *CCA1* (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIAT-

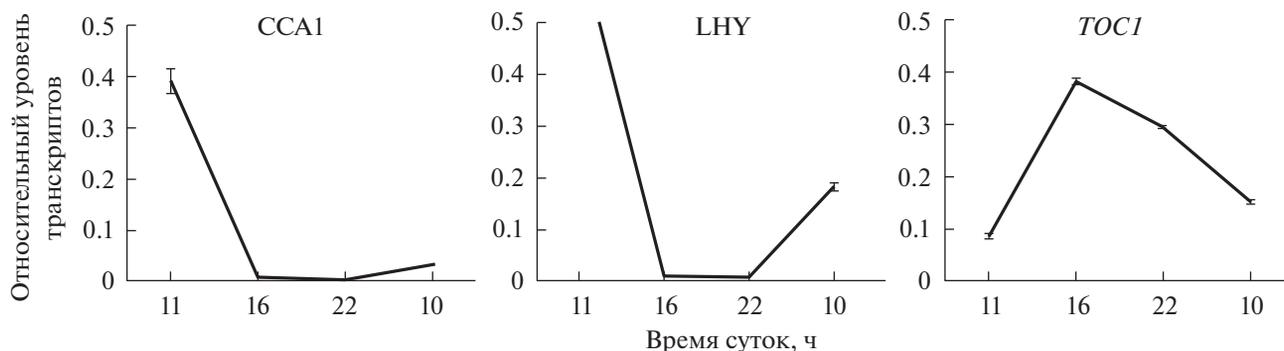


Рис. 3. Кривые накопления транскриптов генов центрального осциллятора в первые сутки прорастания *A. thaliana* в темноте.

ED1), *LHY* (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) и *TOC1* (TIMING OF CAB EXPRESSION 1), а также ряд дополнительных генов. *CCA1* и *LHY* связываются с промотором *TOC1*, негативно регулируя его экспрессию, тогда как *TOC1*, в свою очередь, участвует в положительной регуляции *CCA1* и *LHY* [8]. Суточные кривые накопления транскриптов центрального осциллятора при прорастании с утренним пиком активности *CCA1* и максимумом экспрессии *TOC1* в вечерние часы приведены на рис. 3. Центральный осциллятор ассоциирован с различными физиологическими процессами посредством регуляции экспрессии генов выхода (output genes). К их числу, например, принадлежит ген *SIG5*, контролирующий ритмы транскрипции пластидного гена *psbD*, а также некоторых других пластидных генов (всего 12% пластидных генов, в регуляции которых участвует *SIG5*) [9].

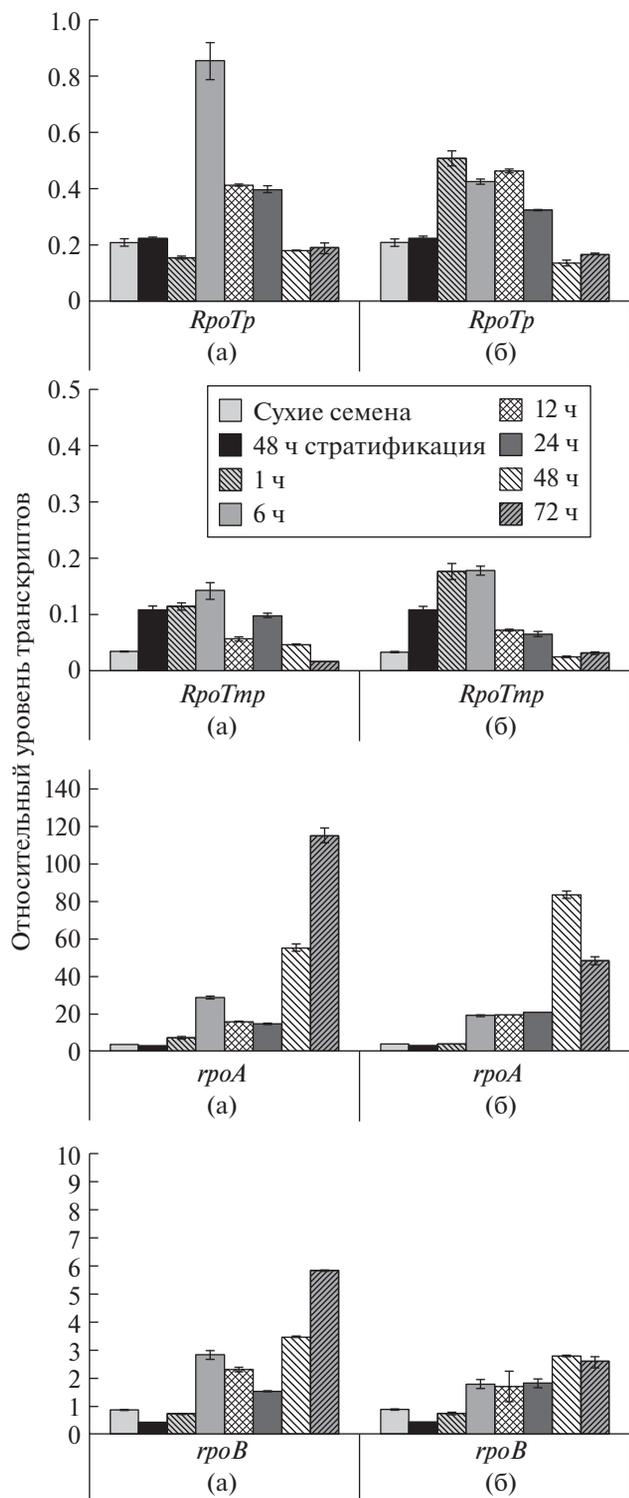
*PAP* гены, вероятно, также относятся к пулу потенциальных генов выхода центрального осциллятора, участвующих в регуляции циркадных ритмов пластидной транскрипции. В пользу этого предположения свидетельствует наличие *cis*-элементов в промоторах ряда *PAP* генов, связывающих компоненты центрального осциллятора (<http://www.athamar.de/>). Эта информация в совокупности с данными о регуляции осциллятором других целевых генов аппарата транскрипции (*SIG1*, 3, 4) [9] позволяет предположить возможность участия *PAP* генов в поддержании ритмичной экспрессии генов пластидного кодирования в соответствии со временем суток. Среди гипотетических кандидатов такого контроля – ген *psbA*, кодирующий D1 белок фотосистемы II. Известно, что, наряду с генами сигма факторов, специфическим регулятором его экспрессии является ген *PAP2* [10].

Различия в уровне экспрессии *PAP* генов при прорастании могли объясняться не только интенсивностью транскрипции и селективной стабильностью транскриптов, но и функциональной спе-

цифичностью белков. Так, например, белок *PAP5* содержит домен PEST, характерный для короткоживущих белков [11]. К тому же, *PAP5*, будучи белком ядерной и пластидной локализации, играет важную роль на начальном этапе биогенеза хлоропластов при переходе от скотоморфогенеза к фотоморфогенезу. Он необходим для формирования фототел при взаимодействии с фоторецептором *phyB* и деградации транскрипционных факторов *PIF1* и *PIF3* (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS 1 и 3), что снимает репрессию с генов фотосинтеза [12]. С белком *PAP5* в ядре способен взаимодействовать *PAP8*, который также представляет собой один из ключевых регуляторов деэтиоляции. *PAP8* участвует в опосредованной фитохромом трансдукции светового сигнала, деградации *PIF1* и *PIF3*, стабилизации *HY5* (ELONGATED HYPOCOTYL5) и накоплении транскриптов *GLK 1* и *2* (GOLDEN2-LIKE 1 и 2), отвечающих за экспрессию ядерных фотосинтетических генов [13].

*PAP6*, в свою очередь, способен взаимодействовать с тиоредоксиновым доменом *PAP10/trxZ in vivo*, и повышенная экспрессия обоих генов, кодирующих эти белки в первые часы прорастания, могла быть связана с защитой транскрипционного аппарата пластид от окислительного стресса, который возникает в ходе деэтиоляции. Высокие уровни относительной экспрессии, особенно на этапе раннего развития проростков, отмечены также для гена *PAP12*. Известно, что в дрожжевой двугибридной системе *PAP12* взаимодействует с белками *PAP3*, 5, 6 и 7, которые участвуют в регуляции редокс состояний, процессах фосфорилирования и фитохром-зависимом световом сигналинге [14].

Динамика накопления транскриптов *PAP* в целом соответствовала значениям экспрессии генов РНК полимеразы пластидного кодирования *proB* и *proA*. Максимум их экспрессии на свету наблюдался через 72 ч, а в темноте через 48 ч после начала прорастания, но уже через 6 ч после начала прорастания содержание транскриптов этих ге-



**Рис. 4.** Экспрессия генов NEP (*RPOTr*, *RPOTrp*) и PER (*rpoA*, *rpoB*) в сухих семенах, в ходе стратификации, а также на первых этапах роста проростков *A. thaliana* на свету (а) и в темноте (б).

нов существенно превышало их уровень в сухих семенах и к исходу стратификации (рис. 4). При этом содержание транскриптов NEP, *RPOTr* и

*RPOTrp* достигало максимальных значений через 1 ч после начала прорастания в темноте и через 6 ч на свету, после чего снижалась. Таким образом, обе системы пластидной транскрипции, NEP и PER, индуцировались непосредственно после начала прорастания, что соответствовало данным Demarsy et al. [15], согласно которым не только NEP, но и PER активны в еще не фотосинтезирующих пластидах прорастающих семян. Особо отметим, что активация экспрессии генов *PAP*, как составной части системы пластидной транскрипции, также происходит уже к исходу стратификации и нарастает в процессе становления транскрипционной системы пластид как на свету, так и в темноте. Это говорит о том, что, по крайней мере на уровне мРНК, *PAP* необходимы для нормального биогенеза пластид с самых ранних этапов прорастания.

Таким образом, нам впервые удалось показать, что экспрессия генов *PAP* при прорастании семян регулируется факторами световой, онтогенетической и циркадной природы. При этом кинетика накопления транскриптов индивидуальных генов, очевидно, определялась их функциональной специфичностью наряду с механизмами корегуляции, интегрирующими работу компонентов транскрипционного аппарата пластид.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00065).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pfanschmidt T., Blanvillain R., Merendino L., et al. // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. P. 6957–6973.
2. Börner T., Aleynikova A.Y., Zubo Y.O., et al. // Biochim. et Biophys. Acta. 2015. V. 1847. P. 761–769.
3. Liebers M., Chevalier F., Blanvillain R., et al. // Planta. 2018. V. 248. P. 629–646. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2924-8>
4. Narsai R., Law R.S., Carrie C., et al., // Plant Physiology. 2011. V. 157. P. 1342–1362.
5. Andreeva A.A., Vankova R., Bychkov I.A., et al. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 1658.
6. Farre E.M., Weise S.T. // Current Opinion in Plant Biology. 2012. V. 15. P. 293–300.
7. Danilova M.N., Kudryakova N.V., Andreeva A.A., et al. // Plant Physiology and Biochemistry. 2018. V. 129. P. 90–100.

8. Lu S.X., Knowles S.M., Andronis C., et al. // Plant Physiology. 2009. V. 150. P. 834–843.
9. Noordally Z.B., Ishii K., Atkins K.A., et al. // Science. 2013. V. 339. P. 1316–1319.
10. Pfalz J., Liere, K., Oelmüller R. // The Plant Cell. 2006. V. 18. P. 176–197.
11. Chen M., Galvao R.M., Li M.N., et al. // Cell. 2010. V. 141. P. 1230–1240.
12. Kusnetsov V.V., Doroshenko A.S., Kudryakova N.V., et al. // Russian Journal of Plant Physiology. 2020. V. 67. P. 971–984.
13. Liebers M., Gillet F-X., Abir I., et al. // EMBO Journal. 2020. V. 39. P. e104941.
14. Yu Q.B., Huang C., Yang Z.N. // Frontiers in plant science. 2014. V. 5. article 316.
15. Demarsy E., Courtois F., Azevedo J., et al. // Plant Physiology. 2006. V. 142. P. 993–1003.

## ONTOGENETIC, LIGHT AND CIRCADIAN REGULATION OF PAP PROTEIN GENES DURING SEED GERMINATION OF ARABIDOPSIS THALIANA

A. A. Andreeva<sup>a</sup>, N. V. Kudryakova<sup>a, #</sup>,

Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov<sup>a</sup>, and V. V. Kusnetsov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

The expression profiles of the PAP genes encoding proteins associated with plastid multisubunit RNA polymerase were studied in dry seeds, during germination, and at the early stages of seedling establishment of *Arabidopsis thaliana*. A detailed analysis of the transcript levels by RT PCR showed that the transition of seeds from dormancy to active growth is accompanied by a drastic increase in the transcript accumulation of all studied genes on the first day of germination, both in the light and in darkness. Subsequent, changes in transcript levels differed among PAP genes and were apparently determined by their functional specificity. It was established for the first time that the expression of individual PAP genes is regulated, by circadian rhythms, in addition to factors of ontogenetic and light nature.

*Keywords:* *Arabidopsis thaliana*, deetiolation, PAP genes, plastid transcription, seed germination

УДК 57

## ВЛИЯНИЕ БИОМЕХАНИЧЕСКОЙ СОВМЕСТИМОСТИ И ТРОМБОГЕННОСТИ НОВОГО СИНТЕТИЧЕСКОГО СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА НА ЕГО ИНТЕГРАЦИЮ В АРТЕРИАЛЬНОЕ РУСЛО (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

© 2021 г. Ю. М. Цыганков<sup>1,\*</sup>, А. А. Сергеев<sup>1</sup>, Ш. Т. Жоржолиани<sup>1</sup>, А. Д. Шепелев<sup>2</sup>, С. В. Крашенинников<sup>2</sup>, Т. Х. Тенчурин<sup>2</sup>, А. В. Агафонов<sup>1</sup>, А. Ю. Городков<sup>1</sup>, академик РАН Л. А. Бокерия<sup>1</sup>

Поступило 18.05.2021 г.

После доработки 22.05.2021 г.

Принято к публикации 23.05.2021 г.

Общим недостатком современных синтетических сосудистых протезов являются тромбогенность и отсутствие биомеханической совместимости с протезируемым сосудом. Для выяснения роли этих факторов в процессах интеграции протеза методом электроспиннинга были изготовлены протезы из известных материалов: поликапролактона, полиуретана и смеси фторсодержащего синтетического каучука СКФ-26 с фторопластом Ф-26. Прорастание протезов сравнивали со стандартным протезом из пористого ПТФЭ при имплантации свиньям в инфраренальный отдел аорты. Упруго-деформационные свойства протезов исследовали методом эластометрии в физиологическом диапазоне нагрузок. Тромбогенность материалов определяли по количеству адгезированных тромбоцитов. Проходимость протезов проверяли по данным аортографии. Прорастание протезов оценивали по данным гистологического исследования. Показано, что при данном наборе материалов биомеханическая совместимость оказалась более важным фактором интеграции, чем тромбогенность материала.

**Ключевые слова:** эластичность, брюшной отдел аорты, пульсация, протез кровеносного сосуда, тромбогенность

Список сокращений: ПТФЭ – политетрафторэтилен, ПУ – полиуретан, ПКЛ – поликапролактон, ПКС – протез кровеносного сосуда

**DOI:** 10.31857/S2686738921050309

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие новой технологии электроформования методом электроспиннинга для изготовления протезов кровеносных сосудов (ПКС) позволяет создавать конструкции с заданными упруго-деформационными свойствами. Применение этой технологии с использованием традиционных синтетических материалов для изготовления изделий этого класса позволило разделить факторы эластичности и тромбогенности по их влиянию на процесс прорастания синтетического протеза при имплантации в артериальный сосуд.

Эластичность протеза является мерой биомеханической совместимости ПКС с отрезками нативного артериального сосуда. Биомеханически совместимый протез обеспечивает геометрический и гидродинамический континуум вдоль пути эволюции потока крови. При этом капсула, формируемая вокруг такого синтетического протеза, деформируется под действием пульсового давления, что неизбежно должно влиять на степень ее организации.

Тромбогенность материала протеза является мерой гемосовместимости и отражает комплекс процессов, происходящих на инородной поверхности при контакте с кровью реципиента. Для проверки тромбогенности оценивали степень адгезии тромбоцитов из нативной крови на поверхности материала в условиях *ex vivo* [1]. Этот метод показал свою релевантность в отношении материалов, контактирующих с потоком крови.

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

\*e-mail: tsigankov\_yura@mail.ru

Целью работы было сравнение процессов вживления трубчатого синтетического матрикса, изготовленного из материалов, отличающихся по тромбогенности и упруго-деформационным свойствам, при имплантации в брюшную аорту свиней.

## МЕТОДЫ

Для оценки тромбогенности цилиндрические камеры с 16 закрепленными образцами материалов перфузировали нативной кровью свиньи со сдвиговой скоростью  $200 \text{ сек}^{-1}$  в течение 1 мин. затем образцы промывали и окрашивали акридиновым оранжевым.

Подсчет тромбоцитов, адгезированных на поверхности материалов, проводили по микрофотографиям в ПО TopView, полученным на люминесцентном микроскопе в ультрафиолетовой зоне спектра (длина волны 330–400 нм). Абсолютным показателем тромбогенности является коэффициент отношения площади, покрываемой тромбоцитами, к общей площади поля, выраженный в процентах. Так как степень адгезии существенно зависит от состояния животного, итоговый результат был представлен в относительных единицах, относительно показателя адгезии тромбоцитов на контрольном образце из фторопласта медицинского класса (Ф-4).

Изготовление трубчатых волоконных сосудистых протезов проводили методом электроспиннинга на однокапиллярной лабораторной установке с высоковольтным источником Spellman SL130PN30/1005 в НИЦ “Курчатовский институт”. Для формования образца использовали капилляр конструкции “колокольчик” [2] с аэродинамическим сопротивлением 10 мм вод. ст. В качестве осадительного электрода использовали заземленный стальной цилиндр длиной 10 см и диаметром торцов 10.5 мм с чистотой поверхности 7. Электрод вращался со скоростью 50 об/мин и совершал возвратно-поступательные движения для получения более равномерного покрытия электрода.

Эластомерию образцов ПКС проводили на универсальной испытательной машине INSTRON 5965 при однократном растяжении с постоянной скоростью и при циклическом растяжении (50 тыс. циклов). Исходные размеры ПКС были подобраны с учетом растяжения протеза при физиологическом пульсирующем давлении [3].

Эксперименты проведены на 12 свиньях самках породы Ландрас. Операции были проведены в условиях ИВЛ, с внутривенной анестезией. Каждому животному в инфраренальный отдел аорты был имплантирован один образец ПКС (диаметр 10 мм, длина 30 мм). Доступ к аорте осуществляли забрюшинно слева. Всего было имплантировано 3 протеза из поликапролактона (ПКЛ), 3 протеза из полиуретана (ПУ), 4 протеза из смеси

СКФ–26 + Ф–26 и 2 стандартных протеза из пористого политетрафторэтилена (ПТФЭ, производства НПК “Экофлон”, Россия). Для повышения стабильности структуры матриксов из СКФ–26 + Ф–26 по отношению к длительным пульсирующим нагрузкам готовые матриксы подвергали радиационной обработке  $\gamma$ -облучением (источник  $\text{Co}^{60}$ ; поглощенная доза 0.3 МГр). Использованные синтетические материалы уже были применены в конструкциях экспериментальных ПКС [4] и в целом удовлетворяют требованиям, предъявляемым к материалам для эндопротезирования.

Контроль проходимости и пульсацию протезов проверяли на 3-й день и на 30-е сутки после имплантации с помощью аортографии. Степень прорастания протеза оценивали по данным гистологического исследования.

Все эксперименты проводили согласно этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных в соответствии с международными нормативно-правовыми документами [5, 6].

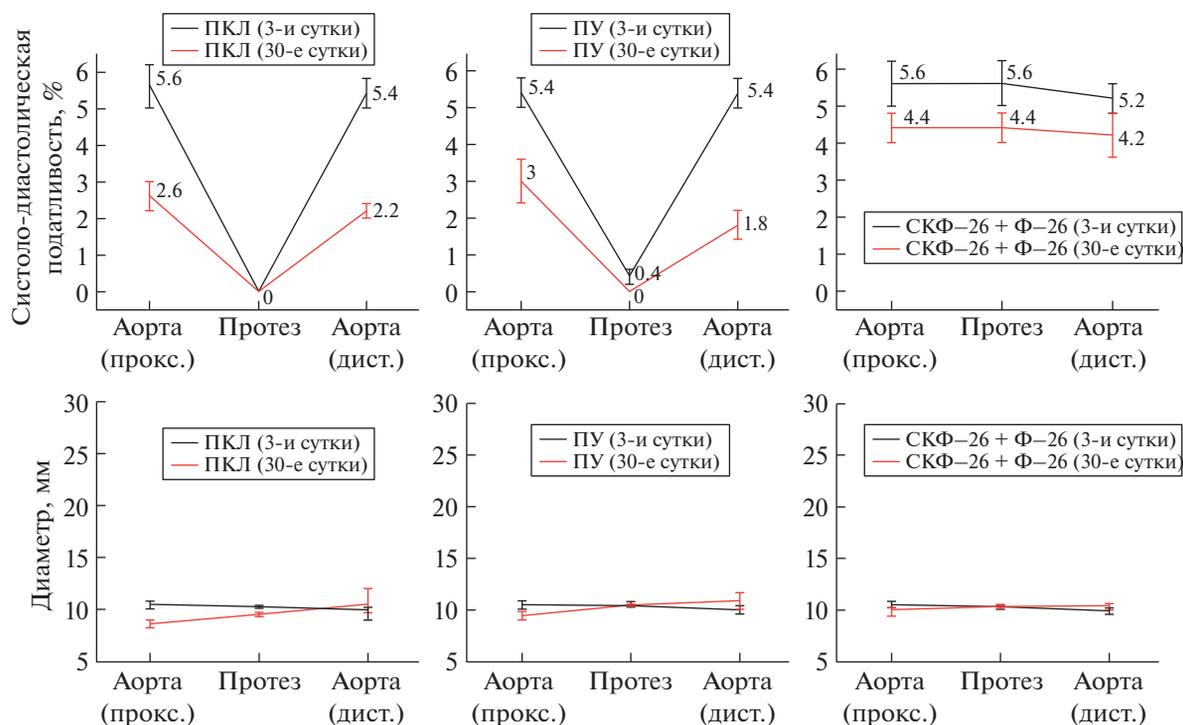
## РЕЗУЛЬТАТЫ

По величине относительного показателя тромбогенности использованные материалы различались следующим образом: ПКЛ (0.065), ПУ (0.102), фторопласт Ф-4 (1.0) и СКФ–26 + Ф–26 (1.748). Таким образом, материал СКФ–26 + Ф–26 проявил максимальные, а материал ПКЛ – минимальные тромбогенные свойства.

Эластометрические исследования трубчатых матриксов из использованных материалов показали, что образцы из ПКЛ практически ригидны при физиологическом уровне нагрузок (податливость при пульсациях 50–150 мм рт.ст. составляла 0.07%/мм рт.ст.), образцы из ПУ обладали умеренной податливостью (0.12%/мм рт.ст.), а податливость образцов из СКФ–26 + Ф–26 была сравнима с податливостью нативной аортальной стенки (0.33%/мм рт.ст.).

Все образцы сосудистых протезов при имплантации в брюшную аорту сохранили проходимость в течение всего срока имплантации (1 мес).

По данным аортографии пульсация образцов протезов из ПКЛ и из ПТФЭ, имплантированных в брюшную аорту, отсутствовала, пульсация у образцов протезов из ПУ была минимальна (0.4%) и сохранялась только в первые сутки после операции. Пульсация образцов протезов из СКФ–26 + Ф–26 лишь немного ослабевала в течение срока имплантации. Систолю-диастолическая податливость аорты при давлении (120/80 мм рт.ст.) проксимальнее протеза СКФ–26 + Ф–26, на 30-е сутки изменилась с 5.4 до 4.4%, а в средней части протеза податливость снизилась с 5.6 до 4.4%. В аорте, дистальнее протеза, податливость



**Рис. 1.** Систоло-диастолическая податливость и диаметр аорты и ПКС из ПКЛ (слева), ПУ (в центре) и СКФ-26 + Ф-26 (справа) при давлении в аорте 120/80 мм рт.ст. на 3-и и 30-е сутки по данным аортографии. Данные для образца протеза из пористого ПТФЭ совпадают с данными для ПКЛ.

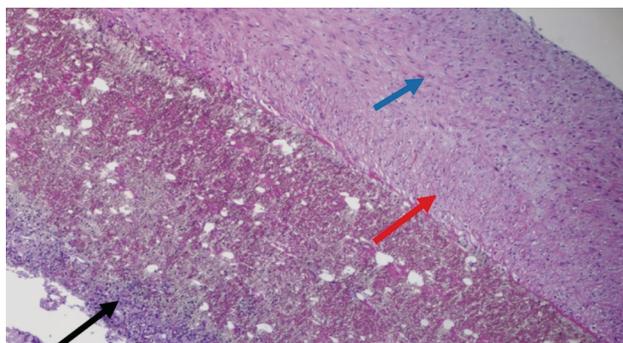
уменьшилась с 5.2 до 4.2%. Средний диаметр протеза СКФ-26 + Ф-26, аорты проксимальнее и дистальнее протеза на 30-е сутки увеличились менее, чем на 2% от первоначальных значений (рис. 1).

По данным гистологического исследования через 1 мес после имплантации капсула образцов протезов из ПКЛ и из ПТФЭ состояла из фиброзной ткани с хаотично расположенными клетками фибробластического ряда и воспалительными инфильтратами. Относительно тонкая капсула образцов протезов из ПУ содержала клетки фибробластического ряда так же без четкой структурной организации.

Капсула образцов протезов из СКФ-26 + Ф-26 имела слоистую структуру. Наружная капсула протеза представлена соединительной тканью. Во внутренней капсуле ближе к просвету сосуда гладкомышечные клетки ориентированы продольно, а гладкомышечные клетки, расположенные ближе к протезу, — поперечно, внутренняя поверхность капсулы протеза покрыта тонкой псевдоинтимой. Строма протеза пронизана соединительной тканью (рис. 2).

По критерию тромбогенности материал СКФ-26 + Ф-26 проявил себя хуже других материалов, тогда как по критерию прорастания трубчатые образцы из этого материала проявили высокую степень интеграции с признаками структурной

дифференциации тканей в составе капсулы. При этом вновь сформированная стенка сосуда имеет слоистую структуру и напоминает строение нативной аорты. Ремоделирование проточного канала аорты вблизи проксимального и дистального анастомозов при имплантации эластичных образцов из СКФ-26 + Ф-26 также было минимальным по сравнению с протезами из других материалов.



**Рис. 2.** Микрофотография образца протеза СКФ-26 + Ф-26. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ . Во внутренней капсуле протеза определяется слоистость структуры, которая проявляется в продольном (синяя стрелка) и поперечном (красная стрелка) расположении гладкомышечных клеток относительно оси сосуда. Видны участки заселения клетками стромы протеза (черная стрелка).

Таким образом, показано, что биомеханическая совместимость имеет более существенное влияние на интеграцию синтетического сосудистого протеза при его имплантации в артериальное сосудистое русло, чем тромбогенность материала. Вероятно, адекватная физиологическая нагрузка пульсовым давлением и функциональная деформация ткани формируемой капсулы в большей степени позволяют обеспечить адекватное качество прорастания синтетического протеза.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-00109).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дюрова Н.Б., Носкова Т.И., Новикова С.П. и др. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью. — Москва, Комитет по новой медицинской технике Минздрава СССР 1991 С. 70.
2. Дружинин Э.А. Производство и свойства фильтрующих материалов Петрянова из ультратонких полимерных волокон. М.: ИздАТ, 2007. 280 с.
3. Zhorzholiani Sh.T., Talygin E.A., Krashennnikov S.V., Tsigankov Y.M., Agafonov A.V., Gorodkov A.Yu. et al. Elasticity change along the aorta is a mechanism for supporting the physiological self-organization of tornado-like blood flow. // Human Physiology. 2018. V. 44. № 5. P. 532–540.
4. Попова И.В. Экспериментальное изучение сосудистого протеза, изготовленного методом электроспиннинга, 14.01.26, ФГБУ “ННИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина” Минздрава России. 29.06.2016.
5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes EST № 123, Strasbourg, 18.03.1986.
6. Euroguide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. 2007. FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations, 25 Shaftesbury Avenue, London W1D 7EG, UK.

## THE EFFECT OF MECHANICAL COMPATIBILITY AND OF THROMBOGENICITY ON THE INGROWTH OF A NEW SYNTHETIC VASCULAR PROSTHESIS (EXPERIMENTAL STUDY)

Y. M. Tsigankov<sup>a, #</sup>, A. A. Sergeev<sup>a</sup>, Sh. T. Zhorzholiani<sup>a</sup>, A. D. Shepelev<sup>b</sup>, S. V. Krashennnikov<sup>b</sup>, T. Kh. Tenchurin<sup>b</sup>, A. V. Agafonov<sup>a</sup>, A. Yu. Gorodkov<sup>a</sup>, and academician of the RAS L. A. Bockeria<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: tsigankov\_yura@mail.ru

Common disadvantages of modern synthetic vascular prostheses are thrombogenicity and lack of biomechanical compatibility with the prothesized vessel. To elucidate the role of these factors in the prosthesis integration, prostheses specimens were made by the electrospinning from the known materials: polycaprolactone, polyurethane and a mixture of fluorine-containing synthetic rubber FKM-26 with fluoroplastic F-26. The germination of the prostheses was compared with standard e-PTFE prosthesis in the pigs' infrarenal aorta. The elastic properties of prostheses were studied by elastometry under the physiological range of loads. The thrombogenicity of the materials was determined by the number of platelets adhered to material surface exposed to native blood. The patency of the prostheses was checked by aortography. The germination of prostheses was assessed in the histological examination. It has been shown that with this set of materials, biomechanical compatibility turned out to be a more important factor of integration than the material thrombogenicity.

*Keywords:* elasticity, abdominal aorta, pulsation, vascular prosthesis, thrombogenicity

УДК 577.352.53

## РОЛЬ ИОНОВ КАЛИЯ В РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ

© 2021 г. В. Л. Замойский<sup>1,\*</sup>, Е. В. Бовина<sup>1</sup>,  
член-корреспондент РАН С. О. Бачурин<sup>1</sup>, В. В. Григорьев<sup>1</sup>

Поступило 11.04.2021 г.  
После доработки 22.05.2021 г.  
Принято к публикации 23.05.2021 г.

Методом patch-clamp в конфигурации whole cell показано, что ионы внешнего калия играют важную роль в регулировании кальций-активируемых хлорных каналов (КАХК). Показана четкая зависимость проводимости КАХК от изменений концентрации ионов калия с наружной стороны мембраны клетки. Влияние, оказываемое калием на проводимость КАХК в диапазоне 0–15 мМ, существенно больше, чем влияние, вызываемое им на другие ионные токи – натриевые или калиевые. Есть основания полагать, что такое изменение проводимости КАХК может вносить свой вклад в патофизиологические процессы, характерные для гипокалиемии и гиперкалиемии.

*Ключевые слова:* метод patch-clamp, клетки Пуркинье мозжечка, кальций-активируемые хлорные каналы (КАХК), ионы калия

DOI: 10.31857/S2686738921050334

Вопрос регуляции кальций-активируемых хлорных каналов (КАХК) является весьма актуальным в свете значительного участия КАХК во многих важнейших физиологических и патофизиологических процессах в организме млекопитающих, в том числе и человека. Доказана роль КАХК в механизмах гипертонии, астмы, муковисцидоза, ноцицепции, нарушении функционирования желудочно-кишечного тракта, урологических патологиях [1–4], замедлении рефлексов и нарушении умственных процессов [5]. Ряд симптомов указывают на то, что нарушения в работе КАХК могут лежать в основе ряда клинических проявлений гипокалиемии [6, 7] и гиперкалиемии [8].

Хотя установлены некоторые механизмы взаимодействия КАХК с различными клеточными сигнальными путями [9], многие другие возможные механизмы регуляции КАХК остаются неисследованными.

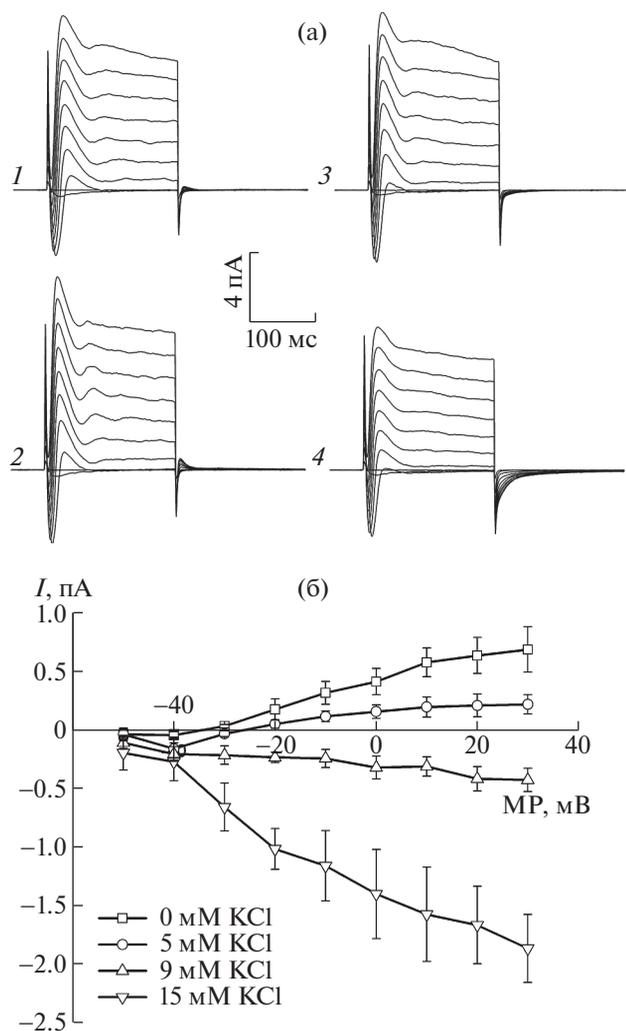
Целью данной работы было исследование роли эндогенных электролитов, а именно, ионов

калия в регуляции токов КАХК. Как известно, калий играет важнейшую роль в физиологических процессах, и даже незначительные изменения в концентрации его ионов в крови или спинно-мозговой жидкости приводят к весьма существенным патофизиологическим процессам, описываемым терминами гипокалиемия и гиперкалиемия.

В результате установлено, что ионы калия с наружной стороны клеточной мембраны играют важную роль в регулировании кальций-активируемых хлорных токов. Показана четкая зависимость амплитуды и потенциала реверсии хлорных токов от изменений концентрации наружного калия. Изменения в работе кальций-активируемых хлорных каналов существенно больше, чем изменения, оказываемые теми же концентрациями наружного калия на другие ионные каналы – натриевые или катионные (калиевые). Есть основания полагать, что изменение амплитуд хлорных токов вносит свой вклад в патофизиологические процессы, характерные для гипокалиемии и гиперкалиемии.

Исследования осуществляли электрофизиологическим методом на свежeweделенных нейронах Пуркинье из мозжечка (12–15 дней) мозга крыс самцов линии Вистар ( $n = 19$ ). Выделение единичных нейронов проводили ферментно-меха-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, Черноголовка, Московская область, Россия  
\*e-mail: vzam@yandex.ru



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций калия во внешнем растворе на амплитуду хлорных токов. а – Кривые записи токов при разных концентрациях калия (потенциал фиксации  $-70$  мВ): 1–5 мМ, 2–0 мМ, 3–9 мМ, 4–15 мМ; б – графики амплитуды хлорных токов при различных концентрациях калия (потенциал фиксации  $-70$  мВ). По оси ординат – величина тока в пА; по оси абсцисс – уровень мембранного потенциала в мВ.

ническим способом [10]. Трансмембранные токи отдельных нервных клеток регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации на целой клетке (whole-cell) с помощью прибора ЕРС-9 (“НЕКА”, Германия) [11]. Данные обрабатывали при помощи программы Pulsfit (“НЕКА”, Германия).

В экспериментах использовали физиологический раствор, содержащий 140 мМ NaCl (140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, HEPES 10 мМ, рН 7.36, осмолярность 305 мосм), в микропипетке–электроре – раствор, содержащий 140 мМ KCl (140 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, EGTA 11 мМ, HEPES 10 мМ, K<sub>2</sub>ATP 5 мМ, рН 7.2, осмолярность 285 мосм).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При потенциале фиксации  $-70$  мВ в ответ на нарастающие ступени деполяризующих импульсов по  $+10$  мВ регистрировались ионные токи от целой клетки, состоящие из токов положительной и отрицательной полярности (рис. 1а).

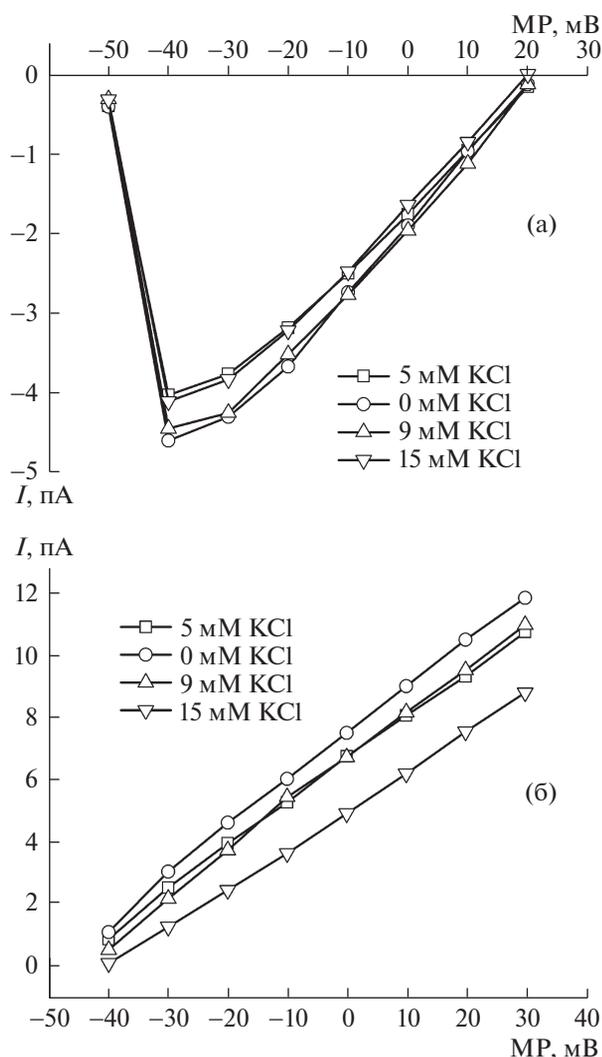
Такие ответы соответствуют классическим представлениям: быстрый, входящий в клетку ток ионов натрия, вызывающий деполяризацию мембраны, и выходящие токи, переносимые ионами калия, компенсирующими деполяризацию на мембране.

По окончании каждого тестового импульса, в зависимости от ионных условий, можно было регистрировать небольшой ток, направленный “вверх” от базовой линии. Максимальная величина этого тока обычно не превышала 100–300 пА. При потенциале на мембране ниже  $-20$  мВ этот ток реверсирует, приобретает входящее направление, однако его амплитуды не превышали 50–80 пА. В предыдущих исследованиях нами было показано, что этот ток является кальций-активируемым хлорным током [12–14]. Уменьшение наружной концентрации ионов калия вело к увеличению (или к появлению, в случае отсутствия при 5 мМ) этого выходящего тока, который достигал максимальных значений (до 1.8 нА) при 0 мМ калия (рис. 1а, 1б). Увеличение концентрации внешнего калия свыше 5 мМ вело к сдвигу потенциала реверсии тока в область  $-60$  мВ на мембране клетки. При концентрации калия порядка 7 мМ происходила полная реверсия направления тока, который становился входящим. На графике видно, что амплитуда входящего тока увеличивалась значительно при увеличении калия до 9 мМ, а особенно она вырастала при увеличении калия до 15 мМ (рис. 1а, 1б). Было также установлено, что амплитуды и проводимость этого тока незначительно зависят от потенциала фиксации: при  $-40$  мВ токи имели несколько большую амплитуду, чем при  $-70$  мВ, а при  $-100$  мВ токи были немногим меньше, чем при  $-70$  мВ.

В то же время влияние изменений в концентрации внешнего калия на входящие быстрые натриевые токи (рис. 2А) и на выходящие (преимущественно, калиевые) токи (рис. 2Б) было незначительным и не превышало 20%.

Наши исследования показали, что изменения в концентрации внешнего калия приводят к существенному изменению амплитуды и проводимости хлорного тока через КАХК. Изменения в работе КАХК существенно больше, чем изменения, оказываемые теми же концентрациями наружного калия на другие ионные каналы – натриевые или катионные (калиевые). Это указывает на то, что калий осуществляет более избирательное действие на токи КАХК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что существует избирательное влияние некоторых



**Рис. 2.** Влияние различных концентраций калия во внешнем растворе на амплитуду входящих и выходящих токов в нейронах Пуркинью. а – график зависимости амплитуды быстрых натриевых токов от концентрации калия (потенциал фиксации –70 мВ); б – график зависимости амплитуды выходящих (преимущественно, калиевых) токов от концентрации калия (потенциал фиксации –70 мВ).

экстраклеточных катионов и анионов на другие ионные каналы. Хорошо известным фактом является четкая зависимость активации целого ряда каналов – калиевых, хлорных и других – от концентрации внутриклеточного кальция. О влиянии каких-либо экстраклеточных ионов на каналы, проводящие отличные от них ионы, известно крайне мало.

Ранее нами показана зависимость быстрых натриевых токов в нейронах Пуркинью от концентрации наружного хлора [15]. Изложенные в этой статье (и ранее) результаты позволяют говорить о

том, что наряду с внутриклеточной регуляцией кальцием в нейронах имеется значительное влияние ряда ключевых ионов – калия, хлора – на функционирование соседних каналов (и проводимых ими токах), осуществляемое ими с наружной стороны мембраны, т.е. концентрациями этих ионов в межклеточной (спинномозговой) жидкости.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00378) и Государственного задания 2019–2020 гг. (тема № 0090-2019-0005).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kunzelmann K., Tian Y., Martins J.R., Faria D., Kongsuphol P., Ousingsawat J., Thevenod F., Roussa E., Rock J., Schreiber R. // *Pflügers Arch.*, 2011. V. 462. P. 195–208.
2. Kamaledin M.A. // *J. Cell Physiol.*, 2018. V. 233. P. 787–798.
3. Ji Q., Guo S., Wang X., Pang C., Zhan Y., Chen Y., An H. // *J Cell Physiol.* 2019. V. 234. P. 7856–7873.
4. Григорьев В.В. // *Биомедицинская химия.* 2021. Т. 67. № 1. С. 17–33.
5. Huang W.C., Xiao S., Huang F., Harfe B.D. et al. // *Neuron.* 2012. V. 12. № 74(1). P. 179–192.
6. Guo S., Chen Y., Pang C., Wang X., Qi J., Mo L., Zhang H., An H., Zhan Y. // *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 2017. V. 469. P. 681–692.
7. Yu K., Whitlock J.M., Lee K., Ortlund E.A., Cui Y.Y., Hartzell H.C. // *Elife.* 2015. V. 4. P. e06901.
8. Wang B., Li C., Huai R., Qu Z. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2015. V. 82. P. 22–32.
9. Crottès D., Jan L.Y. // *Cell Calcium.* 2019. V. 82. P. 102050.
10. Kaneda M., Nakamura H., Akaike N. // *Neurosci. Res.* 1988. V. 5. P. 299–315.
11. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. // *Pflügers Arch.* 1981. V. 391. P. 85–100.
12. Вихарева Е.А., Замойский В.Л., Григорьев В.В., Бачурин С.О. // *ДАН*, 2015. Т. 465, С. 372–374.
13. Вихарева Е.А., Замойский В.Л., Григорьев В.В. // *БЭБМ*, 2016. Т. 162, С. 672–677.
14. Замойский В.Л., Вихарева Е.А., Григорьев В.В., Бачурин С.О. // *ДАН*, 2016. Т. 470. С. 347–349.
15. Замойский В.Л., Григорьев В.В. // *ДАН*, 2017. Т. 477. С. 493–495.

**ROLE OF POTASSIUM IONS IN REGULATION  
OF CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CHANNELS****V. L. Zamoyski<sup>a,#</sup>, E. V. Bovina<sup>a</sup>, Correspondent-Member of the RAS S. O. Bachurin<sup>a</sup>, and V. V. Grigoriev<sup>a</sup>***<sup>a</sup> Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,  
Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation**<sup>#</sup>e-mail: [vzam@yandex.ru](mailto:vzam@yandex.ru)*

Using the patch-clamp method, in the whole cell configuration, it was shown that external potassium ions play an important role in the regulation of calcium-activated chloride channels (CaCC). A clear dependence of conductivity of the CaCC in dependence of external potassium concentration was shown. The effect of external potassium in range 0–15 mM on the conductivity of chloride channels was significantly greater than the effect it has on other ionic currents—sodium or potassium. There is reason to believe that these changes in the conductivity of CaCC may contribute the development of pathophysiological processes like hypokalemia or hyperkalemia.

*Keywords:* patch-clamp method, Purkinje cells of the rat cerebellum, calcium-activated chloride channels (CaCC), potassium ions

УДК 577.122

## ИНДУКЦИЯ ОКСИДОМ АЗОТА ПРОЛИН-ИМИНОПЕПТИДАЗЫ МОЖЕТ БЫТЬ ПРИЧИНОЙ НАКОПЛЕНИЯ ПРОЛИНА В КОРНЯХ ГОРОХА

© 2021 г. А. М. Егорова<sup>1,\*</sup>, академик РАН И. А. Тарчевский<sup>1</sup>

Поступило 14.05.2021 г.

После доработки 26.05.2021 г.

Принято к публикации 28.05.2021 г.

Донор оксида азота (NO) – нитропруссид Na вызывал в корнях проростков гороха повышение содержания пролин-иминопептидазы. Предполагается, что NO вызывает активацию депролинизации обогащенных пролином белков, о чем свидетельствует повышение содержания свободного пролина, как известно, защищающего растения от действия абиотических и биотических стрессоров.

**Ключевые слова:** пролин, оксид азота, фитоиммунитет, нитропруссид Na

**DOI:** 10.31857/S2686738921050085

Общепризнано, что иминокислота пролин является уникальным фактором устойчивости растений к действию разнообразных абиотических и биотических стрессоров. Первоначально сильное повышение содержания пролина под влиянием обезвоживания было обнаружено у проростков райграса [1] и под влиянием почвенной засухи – в листьях, стеблях и колосьях пшеницы [2]. Если в первой работе накопление пролина объяснялось усилением его синтеза, то во второй – его освобождением при деградации белков. В дальнейшем было опубликовано множество экспериментальных и обзорных статей, посвященных различным аспектам пролинологии, и подтверждена роль пролина в повышении устойчивости растений. В большинстве работ повышение содержания пролина объясняли активацией ферментов его синтеза из глутамата и орнитина, что подтверждалось использованием трансгенных растений с усиленной экспрессией генов этих ферментов [3]. После обнаружения и исследования белков, обогащенных пролином (БОП), а также ферментов пролин-иминопептидаз, способных осуществлять депролинизацию БОП, стали допускать возможность накопления пролина за счет деградации БОП.

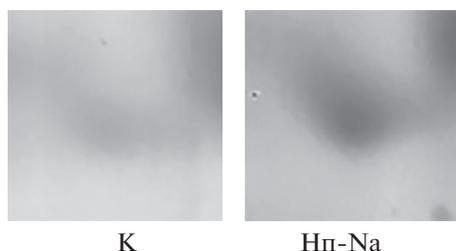
“Пролинологи” отмечают, что роль и функции пролина в адаптации растений к неблагоприят-

ным условиям до сих пор остаются неясными и загадочными [3]. В значительной степени это связано со многими путями синтеза, деградации и использования свободного пролина, их зависимости от силы и продолжительности воздействия одного стрессора или последовательности действия нескольких стрессоров, участия в регуляции пролинового метаболизма фитогормонов и эндогенных ключевых факторов фитоиммунитета.

Одним из таких факторов является монооксид азота (NO), быстро образующийся и накапливающийся в тканях растений при их инфицировании микроорганизмами и вызывающий защитное перепрограммирование экспрессии генов [4]. Необходимо отметить, что ответ на действие NO исследовался в основном на надземных органах растений, но известно, что NO образуется эндогенно и в корнях при действии на них патогенов. Следует также учитывать, что корни могут подвергаться действию экзогенного NO, продуцируемого почвенными микроорганизмами [5]. Учитывая все это, мы поставили перед собой задачу исследовать ответ корней на действие NO с помощью протеомного анализа.

8-дневные проростки гороха *Pisum sativum* L. сорт Тан, выращенные на ¼ питательной среды Хогланда–Арнона, помещались корнями в среду роста, содержащую донор NO – нитропруссид Na (150 мкМ). Обработку проводили в течение 72 ч, с ежедневной сменой растворов. Контролем служили растения, не обработанные нитропруссидом Na. Выделение растворимых белков корней гороха и двумерный электрофорез проводили по методике, использованной в нашей ранее опубли-

<sup>1</sup> Казанский институт биохимии и биофизики  
Федеральный исследовательский центр  
Казанский научный центр РАН, г. Казань, Россия  
\*e-mail: egorova@kibb.knc.ru



**Рис. 1.** Фрагменты двумерных электрофореграмм растворимых белков корней гороха. Показан участок геля, содержащий белок, идентифицированный как пролин-иминопептидаза в контрольных (К) и обработанных нитропруссидом Na (Нп-Na) корнях.

ликующей работе [6]. Разделение белков осуществляли на стрипах с иммобилизованным градиентом pH 4–7, 17 см (Bio-Rad, США). Для выявления белков, содержание которых изменялось под влиянием донора NO, двумерные электрофореграммы анализировали с помощью программы PDQuest 8.1 (Bio-Rad, США). Использовали по три контрольных и обработанных нитропруссидом Na гелей, каждый из которых представлял биологическую повторность. Идентифицировали только белки, содержание которых повышалось более чем в 1.5 раза. Анализ полученных после трипсинолиза пептидов проводили с помощью HPLC-MS/MS масс-спектрометрии на приборе MicrOTOF-Q (Bruker, Германия) с последующим поиском возможных совпадений по MS BLAST, описанным в работе [6]. Анализ первичной структуры белков осуществляли на сервере NCBI.

Содержание пролина в корнях проростков гороха определяли по методу Bates с модификациями [7].

Среди белков, индуцируемых нитропруссидом Na в корнях гороха, была выявлена пролин-иминопептидаза (ПИП), имеющая молекулярную массу 44.7 кДа и pI 5.83. Анализ двумерных электрофореграмм растворимых белков корней горо-

ха показал, что содержание белка под влиянием донора NO повышалось почти в 3 раза (рис. 1).

Выявленная нами ПИП корней гороха была идентифицирована по гомологии с белком XP\_004485649.1 нута [*Cicer arietinum*], с которым совпали 4 пептида, полученные после трипсинолиза. Был проведен поиск BLAST аминокислотной последовательности в базе данных белков гороха <https://urgi.versailles.inrae.fr/blast/> и найдена последовательность белка Psat1g212200.1, содержащая идентифицированные пептиды и имеющая 80% гомологии с белком XP\_004485649.1 из нута. ПИП гороха состояла из 395 аминокислотных остатков.

Идентифицированная нами ПИП относится к суперсемейству альфа/бета гидролаз, семейству пролин-иминопептидаза подобных белков (сериновых экзопептидаз S33). Согласно базе данных пептидаз MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=S33>), для активности этого фермента важна каталитическая триада S-D-H (серин-аспарагиновая кислота-гистидин), содержащая консервативный остаток серина S в последовательности GxSxG (у ПИП гороха S находится в 184 положении). ПИП обладает узкой субстратной специфичностью и отщепляет лишь конечный остаток пролина от полипептидной цепи обогащенных пролином и оксипролином белков. ПИП являются в значительной степени консервативными практически для всех организмов, и, согласно MEROPS, во многих организмах с секвенированными геномами представлены одной или двумя изоформами.

Наш анализ показал, что ПИП корней гороха не имеет транспортного сигнального пептида и, в связи с этим, или функционирует внутри клеток, или его перенос в апопласт осуществляется с помощью неклассического механизма [8]. Неклассическому типу транспорта в последнее время уделяется большое внимание, так как получены факты его связи с защитным ответом клеток [9].

```

1      MNLGFNFGPNTFSLSTTTTTTKFSPSFI FTTPISHPQTNSSGKTKLLRVQNTDNH I HSTPT
61     TTPFMASQQRI PQLNPNFY PDIQPYTTGFLKVS DLHSIYWEQSGNPTGHPVVFLHGGPGG
121    GTSPSNRRFFDPEFYRI IILFDQRGAGKSTPHACLEHNTTWDLIDDIEKLRHLEIPEWQV
181    FGGSWGSTLALAYSQSHPKVTGMVLRGIFLLRKKEIDWFYEGGAAAI FPD A WEPFRDLI
241    PENERGCFIDAYKKRLNSDDIETQYAAARAWTKWEMMTAHLFPNEENVKR GDDDYFSLAF
301    ARIENHYFVNKGFFPSDSFLLDGVDKIRHINTTIVQGRYD ICCPIMSAWDLHKAWPEADF
361    RVVADAGHSANEPGIAAELIAANEKLNILKNKGD

```

**Рис. 2.** Аминокислотная последовательность белка Psat1g212200.1, идентифицированного нами как пролин-иминопептидаза. Жирным шрифтом выделены идентифицированные пептиды. Цветным выделением (желтым) обозначены консервативные аминокислоты, содержащие S-D-H каталитическую триаду.

Полученная нами информация об NO-индукции ПИП в корнях свидетельствует о возможности вызванной этим активации депролинации БОП и накопления свободного пролина. Действительно, мы обнаружили, что нитропруссид Na повышает содержание пролина в корнях гороха в 1.6 раза. Это дополняет еще одной возможной причиной полученные ранее данные о повышении содержания пролина у растений под влиянием NO за счет активации его синтеза [10], а также мнение о том, что гомеостаз пролина тонко регулируется его синтезом, деградацией и транспортом [11].

К БОП относятся, главным образом, компоненты клеточных стенок, которые подразделяются на несколько обширных семейств [12]: наиболее гликозилированные белки – экстенсины; арабиногалактановые белки; собственно БОП; гибридные белки, содержащие не только пролиновые домены, но и консервативные последовательности аминокислот, характерные, главным образом, для липид-переносящих белков; небольшие (менее 200 аминокислот) арабинозилированные белки.

БОП клеточных стенок обладают видо-, органо- и тканеспецифичностью [13] и отличаются большим многообразием. Например, экстенсины и арабиногалактановые белки включают в себя более 100 форм.

Не имеется информации, какие формы БОП являются мишенями ПИП, подобных идентифицированной нами. Это относится и к случаям с использованием трансгенных растений с усиленной экспрессией ПИП, для которых были характерны накопление пролина и повышение устойчивости к неблагоприятным факторам [14–16]. Не исключено, что некоторые формы БОП представляют собой своеобразные хранилища пролина и способны освобождать его с помощью ПИП, индуцируемых при действии стрессоров.

Мишенью ПИП растений не могут быть все виды БОП, так как их депролинация и связанный с ним протеолиз должны были бы отрицательно сказаться на осуществлении барьерной функции клеточных стенок. О важности этой функции в защите растений от патогенов можно судить по фактам продукции ПИП патогенными микроорганизмами для разрушения БОП клеточных стенок растений. Более того, установлено, что ПИП являются факторами вирулентности фитопатогенных бактерий и грибов [17, 18].

Полученные нами данные свидетельствуют о возможном участии в NO-индуцируемом накоплении пролина не только активации его синтеза [10], но и депролинации БОП.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kemble A.R., Macpherson H.T.* Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting // *Biochemical J.* 1954. V. 58. № 1. P. 46–49.
2. *Тарчевский И.А.* Продукты фотосинтеза листьев пшеницы и влияние на их образование почвенной и атмосферной засухи // *Ученые записки КГУ.* 1958. Т. 118. С. 111–153.
3. *Meena M., Divyanshu K., Kumar S., et al.,* Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions // *Heliyon.* 2019. V. 5. № 12. e02952.
4. *Imran Q.M., Hussain A., Lee S-U., et al.,* Transcriptome profile of NO-induced Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes // *Scientific Reports.* 2018. V. 8. № 1. P. 771.
5. *Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J.* Nitric oxide in the offensive strategy of fungal and oomycete plant pathogens // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 252.
6. *Тарчевский И.А., Егорова А.М.* Протеомный анализ влияния циклогексимида на корни гороха // *Физиология растений.* 2015. Т. 62. № 6. С. 893–905.
7. *Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D.* Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* 1973. V. 39. № 1. P. 205–207.
8. *de la Canal L., Pinedo M.* Extracellular vesicles: a missing component in plant cell wall remodeling // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. № 20. P. 4655–4658.
9. *Wang X., Chung K.P., Lin W., et al.,* Protein secretion in plants: conventional and unconventional pathways and new techniques // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 69. № 1. P. 21–37.
10. *Filippou P., Antoniou C., Fotopoulou V.* The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants // *Free Radic Biol Med.* 2013. V. 56. P. 172–183.
11. *Weltmeier F., Ehlert A., Mayer C.S., et al.,* Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 3. P. 3133–3143.
12. *Kishor P.B.K., Kumari P.H., Sunita M.S.L., et al.,* Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 544.
13. *Gujjar R.S., Pathak A.D., Karkute S.G., et al.,* Multifunctional proline rich proteins and their role in regulating cellular proline content in plants under stress // *Biologia plantarum.* 2019. V. 63. P. 448–454.

14. Sun X., Wang F., Cai H., et al., Functional characterization of an Arabidopsis prolyl aminopeptidase AtPAP1 in response to salt and drought stresses // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2013. V. 114. № 3. P. 325–338.
15. Wang Y., Liu H., Wang S., et al., Overexpressing of a novel wheat prolyl aminopeptidase gene enhances zinc stress tolerance in transgenic Arabidopsis thaliana // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015. V. 121. № 2. P. 489–499.
16. Zdunek-Zastocka E., Grabowska A., Branicki T., et al., Biochemical characterization of the triticale TsPAP1, a new type of plant prolyl aminopeptidase, and its impact on proline content and flowering time in transgenic Arabidopsis plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017. V. 116. P. 18–26.
17. Muszevska A., Stepniewska-Dziubinska M.M., Steczkiewicz K., et al., Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 5. P. 9147.
18. Feng L., Schaefer A.L., Hu M., et al., Virulence factor identification in the banana pathogen *Dickeya zeae* MS2 // *Applied and environmental microbiology*. 2019. V. 85. № 23. e01611–19.

## INDUCTION OF PROLINE IMINOPEPTIDASE BY NITRIC OXIDE MAY RESULT IN THE PROLINE ACCUMULATION IN THE PEA ROOTS

A. M. Egorova<sup>a, #</sup> and Academician of the RAS I. A. Tarchevsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: egorova@kibb.knc.ru

The donor of the nitric oxide (NO) sodium nitroprusside upregulated the proline iminopeptidase content in the pea seedling roots. It is assumed that NO activates deprolinization of the proline-rich proteins, confirmed by an increase of the free proline content, known as protecting plants from the abiotic and biotic stressors.

*Keywords:* proline, nitric oxide, phytoimmunity, sodium nitroprusside

УДК 577. 112.3: 597. 851: 574.91

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ ЭНДЕМИЧНОГО И ИНВАЗИВНОГО ВИДОВ ЗЕМНОВОДНЫХ ФАУНЫ УРАЛА

© 2021 г. Л. А. Ковальчук<sup>1,\*</sup>, Л. В. Черная<sup>1</sup>, В. А. Мищенко<sup>1</sup>,  
Д. Л. Берзин<sup>1</sup>, академик РАН В. Н. Большаков<sup>1</sup>

Поступило 20.05.2021 г.  
После доработки 31.05.2021 г.  
Принято к публикации 31.05.2021 г.

Впервые представлены результаты сравнительного анализа свободных аминокислот в плазме крови земноводных фауны Урала: эндемичного вида – сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) и инвазивного вида – озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). Показана видовая разнонаправленность адаптивных стратегий терморезистентных амфибионтов, как к отрицательным, так и к положительным температурам.

**Ключевые слова:** сибирский углозуб, озерная лягушка, аминокислоты, кровь

**DOI:** 10.31857/S2686738921050188

Амфибии, будучи одной из доминирующих групп среди всех классов позвоночных животных, вносят существенный вклад в видовое разнообразие не только водных, но и наземных экосистем. В настоящее время около трети видов этих животных находится под угрозой исчезновения [1, 2]. Представители фауны земноводных Урала из отряда Caudata – сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) и из отряда Anura – озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) вызывают повышенный интерес, поскольку обладают разнонаправленностью адаптивных стратегий как пойкилотермные амфибионты, обитающие в диапазоне экстремально положительных и отрицательных температур [3, 4]. Исследователи отмечают повышенную холодоустойчивость самцов и самок сибирского углозуба и их способность переносить отрицательные температуры до  $-35...-40^{\circ}\text{C}$ , не теряя активности при  $0...+2^{\circ}\text{C}$  [5, 6]. Стратегия существования сибирского углозуба в условиях низких положительных и даже отрицательных температур способствует возможности расширения его ареала, северная граница которого проходит за Полярным кругом. Животные не переносят длительное пребывание на солнце и при температуре в тени около  $+27^{\circ}\text{C}$  погибают. В это же время инвазив-

ный для Урала вид – озерная лягушка толерантна к высоким положительным температурам. На Урале данный вид первоначально заселил термальные водоемы антропогенного происхождения (водоемы-охладители Верхнетагильской и Рефтинской ГРЭС, Свердловская область). Известно его обитание в горячих источниках, где температура воды достигает  $+30^{\circ}\text{C}$ , а иногда и выше [4, 7]. Аминокислоты и их производные, как универсальные биологические модификаторы и регуляторы важнейших метаболических реакций, ответственны за поддержание биологической целостности организма [3]. Известна регуляторная роль свободных АК в формировании адаптивной стратегии животных, обеспечивающая устойчивость популяционного гомеостаза в условиях как водного, так и наземного микроклимата [8–11]. Однако в имеющейся литературе информация о метаболизме свободных аминокислот в плазме крови амфибий фауны Урала не представлена. Впервые нами исследовано содержание свободных аминокислот (АК) в плазме крови половозрелых самцов земноводных ( $n = 11$ ), обитающих в нерестовых водоемах и в прибрежных наземных укрытиях при среднесуточной температуре воздуха  $+23^{\circ}\text{C}$  на территории Свердловской области ( $58^{\circ}0'0''$  с.ш.,  $62^{\circ}0'0''$  в.д.). Климат района исследования континентальный с продолжительной холодной зимой и сравнительно теплым коротким летом. Типичный инвазивный вид – озерная лягушка отловлена в неглубоких заводях реки Тагил. Летом температура воды составляет в среднем  $27.5 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ . В период отлова углозубов в прибрежной зоне водоема – Калиновский пруд на

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

\*e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

**Таблица 1.** Содержание свободных аминокислот (мкмоль/л) в плазме крови самцов *S. keyserlingii* и *P. ridibundus*. Средние значения (m), стандартная ошибка (SE) и доверительный интервал [95%CI]

АК	Сибирский углозуб	Озерная лягушка
Histidine	188.9 ± 5.1 [174.9–203.1]*	80.2 ± 5.9 [65.1–95.3]
Threonine	35.4 ± 0.8 [33.3–37.6]	70.3 ± 6.0 [54.9–85.7]*
Arginine	78.6 ± 4.0 [67.5–89.8]*	38.6 ± 1.6 [34.5–42.6]
Valine	31.9 ± 0.9 [29.6–34.3]	81.9 ± 3.9 [71.6–92.1]*
Methionine	72.4 ± 2.3 [66.3–78.6]*	18.4 ± 2.8 [11.3–25.5]
Phenylalanine	27.4 ± 0.9 [24.9–29.8]	49.1 ± 3.0 [41.3–56.9]*
Isoleucine	7.7 ± 0.2 [7.2–8.2]	61.5 ± 2.6 [54.7–68.2]*
Leucine	33.8 ± 1.1 [30.9–36.8]	221.2 ± 12.4 [189.3–253.0]*
Lysine	103.3 ± 1.2 [99.9–106.6]	195.3 ± 7.3 [176.7–213.9]*
НАК	579.6 ± 5.8 [563.4–595.7]	816.4 ± 19.5 [766.3–866.4]*
Фонд свободных АК	1086.1 ± 15.4 [1043.2–1128.9]	1470.4 ± 49.0 [1344.0–1596.3]*

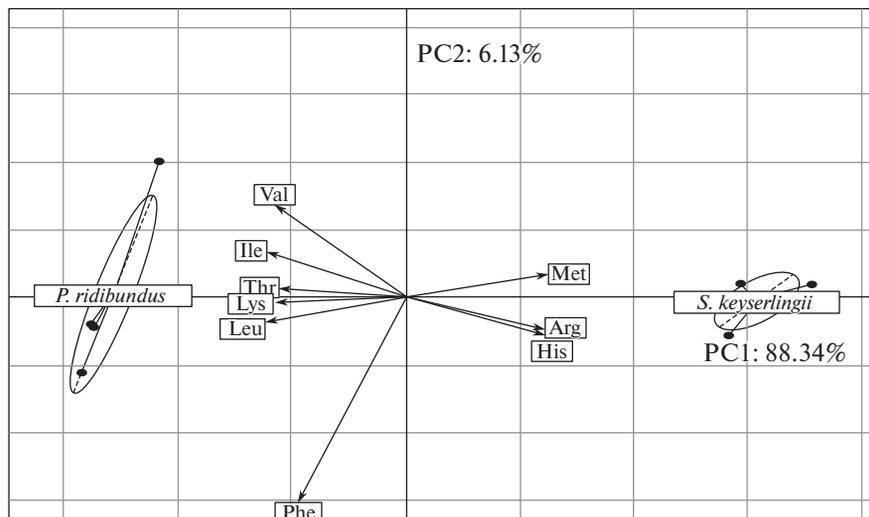
Примечание: \* – статистически значимые различия между группами, тест Тьюки (ANOVA),  $p < 0.0001$ ; НАК – незаменимые аминокислоты.

территории лесопарка городской агломерации Екатеринбургa, температура воды составляла в среднем  $21 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . Животных доставляли в лабораторию в день отлова в июле–августе 2019 г. Образцы крови животных брали из миокарда. Плазму получали центрифугированием крови в рефрижераторной ультрацентрифуге K-23D (Германия) в вакутайнерах “Bekton Dickinson BP” (Великобритания) с ЭДТА в течение 15 мин при 3000 об/мин. Содержание свободных аминокислот (АК) в плазме крови животных определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе Agilent 1260 Infinity II (Германия). Концентрацию АК выражали в мкмоль/л и в процентах от суммарного содержания. Выполнен анализ 187 аминокислотных проб. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (РСА) реализован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan” и “Ade4”) [12].

Аминокислотный спектр плазмы крови амфибий представлен 17 АК: аспарат, глутамат, серин, гистидин, глицин, треонин, аргинин, аланин, тирозин, цистеин, валин, метионин, фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, пролин. Сравнительный анализ показал значимые межвидовые различия по фонду свободных АК в плазме крови: у озерной лягушки  $1470.4 \pm 49.0$  мкмоль/л и сибирского углозуба  $1086.1 \pm 15.4$  мкмоль/л ( $p < 0.0001$ ). У исследованных амфибий, как и у теплокровных животных, присутствует полный спектр функционально значимых незаменимых АК: треонин, валин, лизин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, аргинин, гистидин (табл. 1). Следует отметить, что незаменимые АК не могут быть по-

лучены в процессе биосинтеза и должны поступать в организм в виде пищевых белков извне, а отсутствие НАК ведет к угрожающим жизни явлениям [9]. Заслуживает внимание высокое процентное содержание НАК в крови сибирского углозуба – 53.4% и у озерной лягушки – 55.6% от общего фонда АК. По данным исследователей на равновесие азотистого и белкового обмена в организме амфибий указывает коэффициент отношения метаболических групп: незаменимых АК к заменимым АК [8–10]. Отмечен стабильно высокий аминокислотный баланс в плазме крови как у сибирского углозуба:  $K_{\text{НАК/ЗАК}} = 1.15$ , так и у озерной лягушки  $K_{\text{НАК/ЗАК}} = 1.25$ .

Аминокислотный спектр плазмы крови амфибионтов отражает не только энергетический метаболизм, участие в синтезе белка, но и его адаптивную роль в эволюционно закрепленных процессах при изменчивости широкого диапазона температур среды обитания. Доминирующими АК плазмы крови сибирского углозуба являются аспарат, цистеин, аргинин и гистидин: их суммарное содержание – 48% от общего пула, что в 3.6 раза выше, чем у озерной лягушки. Высокая концентрация гликогенного аспарата в плазме крови сибирского углозуба свидетельствует также и о его роли в качестве низкотемпературного адаптогена для этого вида [14]. Наибольший вклад в фонд незаменимых АК углозуба вносят аминокислоты, кратность превышения которых в сравнении с озерной лягушкой составила для гистидина – 2.4; аргинина – 2.0; метионина – 3.9. Следует отметить и высокое суммарное содержание метионина и цистеина, как иммуномодуляторов в плазме крови углозубов ( $177.6$  мкмоль/л),



**Рис. 1.** Содержание незаменимых аминокислот (% от фонда АК) плазмы крови самцов сибирского углозуба *S. keyserlingii* и озерной лягушки *P. ridibundus* в пространстве главных компонент. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненной главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями (аминокислоты); эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

что на порядок превышает содержание этих АК (16.3 мкмоль/л) у озерной лягушки.

Полученные нами, а также литературные данные, позволяют считать, что значительная аккумуляция представленных аминокислот в плазме крови сибирского углозуба способствует защите клеточных мембран от функциональной дестаби-

лизации и, возможно, предполагает их протекторную роль в условиях низких температур [10, 13–15].

У теплоустойчивой озерной лягушки суммарное содержание основных гликогенных АК: аланина (16.5%), глутамата (6.2%), глицина (9.3%) от общего фонда АК составляет 32%, что в 2.0 раза выше, чем у углозуба. Особенностью АК фонда

**Таблица 2.** Результаты компонентного анализа незаменимых аминокислот (% от фонда АК) в плазме крови самцов сибирского углозуба и озерной лягушки (коэффициенты корреляции между 9 аминокислотами плазмы крови и основными компонентами PC1 и PC2 [пакет “Ade4”])

АК, % ( $i = 9$ )	Нагрузки (loadings, $a_{ij}$ )		Вклад в главную компоненту (Contribution = $(a_{ij}^2 * 100) / \lambda_j$ , %)	
	Главные компоненты (Principal Components – PC), $j = 1, 2$			
	1	2	1	2
Histidine	0.98***	-0.12	12.17	2.52
Threonine	-0.89**	0.03	10.04	0.14
Arginine	0.98***	-0.10	12.12	1.82
Valine	-0.92***	0.29	10.71	15.25
Methionine	0.99***	0.07	12.22	0.84
Phenylalanine	-0.76*	-0.64	7.24	74.71
Isoleucine	-0.98***	0.14	12.04	3.62
Leucine	-0.99***	-0.08	12.27	1.04
Lysine	-0.94***	-0.02	11.19	0.06
	Собственные значения (eigenvalues, $\lambda_j$ ) PC		Дисперсия, объясненная PC (%)	
	7.95	0.55	88.34	6.13

Примечание: статистически значимые коэффициенты корреляции \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , \*\*\* –  $p < 0.001$ .

лягушки, согласно нашим результатам, являются значительные концентрации лейцина до 15.1% и лизина до 13.3% от общего пула. Доминирующая аккумуляция этих АК дает основание полагать, что их высокое содержание, обусловленное участием в энергообменных процессах, предполагает и особую резервную роль в обеспечении устойчивости и толерантности лягушек к околонулевым температурам [11, 14, 15].

Методом главных компонент визуализирована видовая специфика незаменимых аминокислот плазмы крови сибирского углозуба *S. keyserlingii* и озерной лягушки *P. ridibundus*. По первой главной компоненте (PC1), на которую приходится 88.34% общей дисперсии данных, показана существенная пространственная дифференциация особей озерной лягушки и сибирского углозуба согласно процентному содержанию незаменимых АК в плазме крови (рис. 1). Наиболее высокие корреляции с PC1 отмечены для гистидина (0.98), аргинина (0.98), метионина (0.99), особенно высокое содержание которых в крови характерно для особей углозуба, а также изолейцина (−0.98) и лейцина (−0.99) — для лягушек ( $p < 0.001$ ). Вклад каждой из этих эссенциальных аминокислот в межвидовые различия превышает 12.03% (табл. 2).

Наименьший вклад в общую дисперсию данных вносит фенилаланин (7.24%), его корреляция с PC1 составила −0.76 ( $p < 0.05$ ). Для процентного содержания этой ароматической аминокислоты в крови исследуемых групп амфибий были отмечены наименьшие, но статистически значимые, межвидовые различия ( $p < 0.01$ ).

Таким образом, впервые исследовано содержание свободных аминокислот в плазме крови земноводных фауны Урала: эндемичного вида — сибирского углозуба и инвазивного вида — озерной лягушки. Полученные результаты позволяют оценить видовую специфику аминокислотного спектра, обеспечивающего выживание и эврибионтность исследованных видов в широком температурном диапазоне.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных в лаборатории осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и научных целей (European convention..., 1986).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., et al. Status and trends of amphibian decline and extinction worldwide // Science. 2004. V. 306. № 5702. P. 1783–1786.
2. Global amphibian assessment. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2008. Cambridge, UK. Available from: <http://www.globalamphibians.org>
3. Hochachka P.W., Somero G.N. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press. New York; 2002.
4. Большаков В.Н., Вершинин В.Л. Амфибии и рептилии Среднего Урала. Екатеринбург; 2005.
5. Куницын А.А. Материалы по распространению и экологии сибирского углозуба (*Hynobius keyserlingii*, Dybovsky, 1870) // Байкальский зоологический журнал. № 3. С. 31–34.
6. Берман Д.И., Мещерякова Е.Н., Булахова Н.А. Экстремальные отрицательные температуры и потери массы сибирским углозубом (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Hynobiidae) // Доклады Академии Наук. 2016. Т. 468. № 5. С. 590–593.
7. Лада Г.А., Тепляков А.А. Особенности биологии озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) в условиях теплового загрязнения // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2014. Т. 19. № 1. С. 194–196.
8. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition // Amino Acids. 2009. V. 37. № 1. P. 1–17.
9. Mishchenko V.A., Kovalchuk L.A., Bolshakov V.N., et al. Comparative Analysis of the Amino Acid Spectrum of Blood Plasma in Chiroptera (*Vespertilio murinus* L., 1758 and *Myotis dasycneme* B., 1825) in the Fauna of the Ural Mountains // Doklady Biological Sciences. 2018. V. 481. № 6. P. 157–159.
10. Kovalchuk L.A., Mishchenko V.A., Mikshevich N.V., et al. Free amino acids profile in blood plasma of bats (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) exposed to low positive and near-zero temperatures // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2018. V. 54. № 4. P. 281–291.
11. Каранова М.В. Влияние острого холодового шока на пулы свободных аминокислот прудовой рыбы ротана *Percottus glehni* (Eleotridae, Perciformes) // Известия РАН. Серия биологическая. 2011. № 2. С. 153–161.
12. Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J. The ade 4 package-I: One-table methods // R News. 2004. № 4. P. 5–10.
13. Озернюк Н.Д. Температурные адаптации. М.: изд-во Московского ун-та. 2000.
14. Каранова М.В. Вторичные метаболиты и аспарагиновая кислота в мозге амфибий *R. temporaria* как низкотемпературные адаптогены // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2020. Т. 56. № 3. С. 207–212.
15. Li N.G. Relationships between cold hardiness, and ice nucleating activity, glycerol and protein contents in the hemolymph of caterpillars, *Aporia crataegi* L. // Cryo Letters. 2012. V. 33. № 2. P. 134–142.

## AMINO ACID SPECTRUM IN THE BLOOD OF THE ENDEMIC AND INVASIVE AMPHIBIAN SPECIES IN THE FAUNA OF THE URAL

L. A. Kovalchuk<sup>a, #</sup>, L. V. Chernaya<sup>a</sup>, V. A. Mishchenko<sup>a</sup>, D. L. Berzin<sup>a</sup>,  
and academician of the RAS V. N. Bolshakov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Plant and Animal Ecology  
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: kovalchuk@ipae.uran.ru

For the first time, the results of a comparative analysis of free amino acids in the blood plasma of amphibians of the Ural fauna are presented: an endemic species - the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) and an invasive species – the lake frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771). The species diversity of adaptive strategies of thermoresistant amphibions, both to negative and positive temperatures, is shown.

*Keywords:* Siberian salamander, lake frog, amino acids, blood

УДК 57.01

## СКАНИРУЮЩАЯ ОПТИЧЕСКО-ЗОНДОВАЯ НАНОТОМОГРАФИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ БИОМАТЕРИАЛОВ И КЛЕТОК

© 2021 г. О. И. Агапова<sup>1</sup>, А. Е. Ефимов<sup>1</sup>, Л. А. Сафонова<sup>1</sup>,  
М. М. Боброва<sup>1</sup>, И. И. Агапов<sup>1, \*</sup>, академик РАН С. В. Готье<sup>1, 2</sup>

Поступило 20.04.2021 г.

После доработки 04.06.2021 г.

Принято к публикации 04.06.2021 г.

Создание новых эффективных биоискусственных конструкций для задач тканевой инженерии и регенеративной медицины требует разработки и внедрения новых технологических подходов для анализа микро- и наноструктурных особенностей конструкций на основе биоматериалов и их взаимодействия с клетками. В работе представлен новый метод трехмерного мультипараметрического анализа наноструктуры – сканирующая оптическое-зондовая нанотомография в применении к анализу клеток и биоматериалов. Коррелятивная реконструкция распределений флуоресцентных маркеров и особенностей наноструктуры позволяет выполнить количественную оценку ряда параметров трехмерной наноморфологии фибробластов и клеток гепатокарциномы человека Нер-G2, адгезированных на биодеградируемые скаффолды на основе фиброина шелка. Разработанная технология с использованием принципов сканирующей оптического-зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерной микро- и наноструктуры биоматериалов и клеток различных типов.

*Ключевые слова:* сканирующая зондовая нанотомография, флуоресцентная микроскопия, фибробласты, клетки гепатокарциномы человека Нер-G2, фиброин шелка, биосовместимые скаффолды

**DOI:** 10.31857/S2686738921050036

Разработка новых эффективных конструкций для применения в тканевой инженерии и регенеративной медицине требует поиска новых материалов и создания конструкций для обеспечения адгезии и пролиферации клеток различных типов. Для всестороннего изучения взаимодействия клеток с конструкциями необходимы разработка и внедрение новых технологических подходов для анализа микро- и наноструктурных особенностей конструкций и клеток в их составе, а также количественной оценки параметров взаимодействия клеток с поверхностью конструкций на микро- и наномасштабе.

Для проведения подобных исследований в настоящий момент используются различные варианты микроскопии, такие как электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, оптическая микроспектроскопия высокого разрешения, каждый из которых обладает значительным потенциалом. Для комплексного анализа микро- и наноструктуры конструкций и клеток в их составе перспективным направлением является разработка технологии, комбинирующей различные техники микроскопии для коррелятивных исследований [1]. Такой подход позволяет проводить коррелятивные исследования с высоким разрешением, что дает возможность получить новую уникальную информацию о микро- и наноструктуре и свойствах биологических объектов.

Нами разработана уникальная технология сканирующей оптического-зондовой нанотомографии (СОЗНТ), комбинирующая ультрамикротом и сканирующий зондовый микроскоп (СЗМ) в одном устройстве в корреляции с методами флуоресцентной оптической микроскопии [2]. Использование методики СОЗНТ позволяет изучать трехмерную микро- и наноструктуру конструкций на основе биосовместимых материалов, клеток, тканей и тканеинженерных конструкций, в корреляции с исследованием локализации флуо-

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

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

\*e-mail: igor\_agapov@mail.ru

ресцентных маркеров в объеме изучаемых образцов. В том числе разработанный метод может быть успешно использован для определения параметров трехмерной наноморфологии биodeградируемых скаффолдов с культивированными клетками.

Ниже представлены исследования образцов клеток линий мышинных фибробластов 3T3 и гепатокарциномы человека Hep-G2 на скаффолдах из фиброина шелка. Конструкции для культивирования клеток получали из фиброина шелка тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Данный материал обладает уникальным сочетанием свойств, которые позволяют получать конструкции с различной структурой на его основе для применения во множестве областей регенеративной медицины и тканевой инженерии [3–5]. Биосовместимость конструкций на основе фиброина шелка обеспечивает эффективное культивирование клеток, в том числе, адгезию клеток, а физико-химические свойства конструкций позволяют проводить различные манипуляции для пробоподготовки образцов для СЗОНТ, что позволяет рассматривать их как перспективные подложки для проведения исследований методом СЗОНТ. Скаффолды в виде пленок на основе фиброина шелка для культивирования клеток были получены по протоколу, описанному в [6].

В экспериментах использовали клеточные линии мышинных фибробластов 3T3 и гепатокарциномы человека Hep-G2. Для получения образцов с клетками для исследований методом СЗОНТ суспензию клеток в среде инкубации переносили в подготовленные лунки 48-луночных планшетов из расчета 2000 клеток на лунку в 500 мкл среды инкубации. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для исследований клеток на скаффолдах методом флуоресцентной СЗОНТ клетки предварительно окрашивали флуоресцентными красителями FITC и DAPI. В ходе получения образца для СЗОНТ производили дегидратацию образцов скаффолдов с адгезированными клетками проводкой по спиртам с увеличивающейся концентрацией и заливку образцов в эпоксидную среду [3].

Трехмерный СЗОНТ-анализ образцов выполнялся с использованием специализированного СЗМ, комбинированного с ультрамикротом Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Австрия) для сканирующей зондовой нанотомографии [2]. Данная уникальная научная установка – система зондово-оптической 3D-корреляционной микроскопии (<http://skp-gf.ru/usu/486825/>), созданная с участием авторов настоящей работы, – позволяет выполнять серийные СЗМ-измерения наноструктуры поверхности объектов непосредственно после последовательных сверхтонких срезов образца ультрамикротомом в корреляции с флуоресцент-

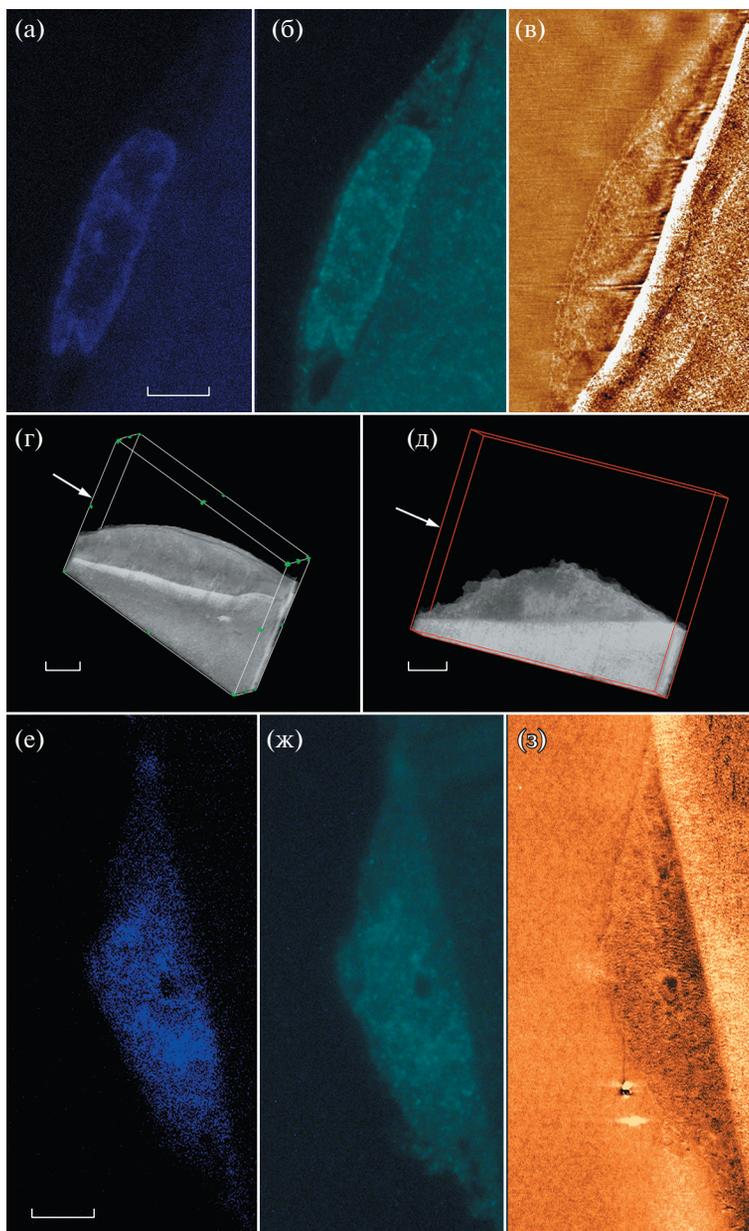
ной оптической микроскопией той же области среза образца.

На рис. 1а–1в представлены результаты коррелятивных измерений клетки Hep-G2 – флуоресцентные изображения высокого разрешения, отображающие окрашивания DAPI и FITC и СЗМ-изображение того же участка клетки, адгезированной на скаффолд. Полученные изображения позволяют выделить оформленное ядро, занимающее значительный внутренний объем клетки, внутри которого выделяются области хроматина, а также белковые структуры. Анализ поверхности среза при помощи СЗМ позволяет значительно повысить разрешение по сравнению с оптическими методами. Полученные коррелятивные флуоресцентные и СЗМ-изображения фибробласта представлены на рис. 1е–1з. По результатам коррелятивного анализа помимо ядра в клетке были обнаружены множественные включения белковой природы.

Для трехмерных реконструкций фрагментов фибробласта и клетки гепатокарциномы человека Hep-G2 было получено соответственно 16 и 24 последовательных СЗМ-изображений участков скаффолдов с адгезированными клетками после последовательных срезов образца толщиной 150 нм. Полученные при помощи программного пакета Image Pro Plus 6.0 3DConstructor (MediaCybernetics Inc.) визуализации трехмерной структуры фибробласта и клетки гепатокарциномы человека Hep-G2 показаны на рис. 1г, 1д.

Совокупность данных, полученных в результате трехмерной реконструкции методом СЗОНТ, дает возможность вычислить ряд морфологических параметров изучаемых клеток, таких как средняя шероховатость поверхности клетки  $R_a$ , эффективная площадь поверхности  $\sigma$  и длина автокорреляции поверхности клетки  $L_1$ . Разработанные нами алгоритмы вычисления этих параметров на основе данных СЗМ подробно описаны в [7]. Стоит отметить, что данные трехмерные параметры невозможно вычислить из двумерных данных, получаемых при помощи стандартных методов СЗМ, флуоресцентной или электронной микроскопии. Шероховатость поверхности клеточной мембраны является важным цитологическим параметром, задействованным в ряде клеточных механизмов, включая клеточную подвижность, адгезию и межклеточные контакты [8–10]. Она может служить чувствительным индикатором состояния клетки [11–13].

Параметры  $\sigma$  и  $L_1$  характеризуют степень развитости и характерные латеральные размеры особенностей рельефа поверхности клетки соответственно. Данные параметры также важны для оценки состояния и биологической активности клетки [14].



**Рис. 1.** Анализ образцов клеток гепатокарциномы человека Нер-G2 и фибробластов 3Т3, культивированных на скаффолдах в виде пленок на основе фиброина шелка. а – флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда с адгезированной клеткой Нер-G2, окрашивание DAPI, увеличение  $\times 1000$ , размерный отрезок – 5 мкм; б – коррелятивное флуоресцентное изображение той же области, окрашивание FITC; в – коррелятивное СЗМ-изображение топографии поверхности среза в той же области, размер скана  $32 \times 20$  мкм, диапазон вариации высоты 9 нм. г – Трехмерная СЗМ-реконструкция фрагмента клетки гепатокарциномы человека Нер-G2, адгезированной на скаффолд,  $32.0 \times 22.0 \times 3.6$  мкм, толщина среза 150 нм, размерный отрезок 5 мкм. Стрелка указывает плоскость сечения, соответствующую СЗМ-изображению, приведенному на панели в. д – Трехмерная СЗМ-реконструкция фибробласта, адгезированного на скаффолд,  $31.0 \times 25.0 \times 2.4$  мкм, толщина среза 150 нм, размерный отрезок 5 мкм. Стрелка указывает плоскость сечения, соответствующую СЗМ-изображению, приведенному на панели з. е – флуоресцентное изображение поверхности среза скаффолда с адгезированным фибробластом, окрашивание DAPI, увеличение  $\times 1000$ , размерный отрезок – 5 мкм; ж – коррелятивное флуоресцентное изображение той же области, окрашивание FITC; з – коррелятивное СЗМ-изображение топографии поверхности среза в той же области, размер скана  $32 \times 15.4$  мкм, диапазон вариации высоты 15 нм.

Также использованный метод позволяет вычислить максимальную толщину адгезированной клетки как высоту поверхности клетки над по-

верхностью скаффолда н. Параметры, полученные в результате анализа трехмерных структур фибробласта и клетки гепатокарциномы челове-

**Таблица 1.** Морфологические параметры реконструированной трехмерной структуры фибробласта и клетки гепатокарциномы человека Нер-G2

Исследуемая клетка	Параметр	Значение
Фибробласт	$R_a$ , нм	$146.5 \pm 14.8$
	$\sigma$ , ед	$1.21 \pm 0.03$
	$L_1$ , нм	$248 \pm 25$
	$h$ , мкм	$6.10 \pm 0.1$
Нер-G2	$R_a$ , нм	$39.5 \pm 5.8$
	$\sigma$ , ед	$1.08 \pm 0.02$
	$L_1$ , нм	$324 \pm 32$
	$h$ , нм	$6.17 \pm 0.1$

ка Нер-G2, адгезированных на поверхность скаффолда на основе фиброина шелка, представлены в табл. 1.

Необходимо отметить, что для проанализированной клетки гепатокарциномы человека Нер-G2 количественные параметры, характеризующие степень шероховатости и развитости ее поверхности, значительно ниже, чем для фибробласта, адгезированного на аналогичный скаффолд на основе фиброина шелка. Это может быть связано с тем, что данная клетка плотнее адгезирует к субстрату. Полученные данные позволяют оценить также объем ядра клетки Нер-G2 на уровне  $940 \pm 100$  мкм<sup>3</sup>, что составляет  $7.3 \pm 1.5\%$  от общего объема клетки.

Разработанная технология исследования трехмерных характеристик наномасштабной морфологии фибробластов и клетки гепатокарциномы человека Нер-G2, адгезированных на биодеградируемые скаффолды на основе фиброина шелка, с использованием принципов сканирующей оптической зондовой нанотомографии применима для исследования особенностей трехмерной микро- и наноструктуры клеток и клеточно-инженерных конструкций различных типов.

#### 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. *Caplan J., Niethammer M., Taylor R.M.II, et al.* The Power of Correlative Microscopy: Multi-modal, Multi-scale, Multi-dimensional // *Curr Opin Struct Biol.* 2011. V. 21 № 5. P. 686–693.
2. *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., et al.* An instrumental approach to combining confocal microspectroscopy and 3D scanning probe nanotomography // *Ultramicroscopy.* 2017. V. 182. P. 118–123.
3. *Efimov A.E., Moisenovich M.M., Bogush V.G., et al.* 3D nanostructural analysis of silk fibroin and recombinant spidroin 1 scaffolds by scanning probe nanotomography // *RSC Advances.* 2014. V. 4. P. 60943–60947.
4. *Vepari C., Kaplan D.L.* Silk as a Biomaterial // *Progress in Polymer Science.* 2007. V. 32. P. 991–1007.
5. *Koh L.-D., Cheng Y., Teng C.-P., et al.* Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials // *Progress in Polymer Science.* 2015. V. 46. P. 86–110.
6. Патент РФ на изобретение № 2740872. МПК G01Q 60/00, B82Y 35/00. Подложка для исследования биологического образца методом сканирующей зондовой нанотомографии и способ ее получения / Агапов И.И., Агапова О.И., Боброва М.М., и др., Дата подачи заявки: 27.07.2020. Опубликовано: 21.01.2021. // Бюл. № 3.
7. *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. V. 7 № 15. P. 8808–8815.
8. *Keren K., Pincus Z., Allen G. M., et al.* Mechanism of shape determination in motile cells // *Nature.* 2008. V. 453. P. 475–481.
9. *Krobath H., Schütz G. J., Lipowsky R., et al.* Lateral diffusion of receptor-ligand bonds in membrane adhesion zones: Effect of thermal membrane roughness // *Europhysics Letters.* 2007. V. 78. P. 38003/1–38003/6.
10. *Reister E., Bihl T., Seifert U., et al.* Two intertwined facets of adherent membranes: Membrane roughness and correlations between ligand–receptors bonds // *New Journal of Physics.* 2011. V. 13. P. 025003/1–025003/15.
11. *Antonio P.D., Lasalvia M., Perna G., et al.* Scale independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2012. V. 1818 P. 3141–3148.
12. *Lee H., Veerapandian M., Kim B.T., et al.* Functional nanoparticles translocation into cell and adhesion force curve analysis // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2012. V. 12. P. 7752–7763.
13. *Wang Y., Xu C., Jiang N., et al.* Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy // *Scanning.* 2016. V. 38. P. 558–563.
14. *Staykova M., Holmes D.P., Read C. et al.* Mechanics of surface area regulation in cells examined with confined lipid membranes // *PNAS.* 2011. V. 108. P. 9084–9088.

## SCANNING OPTICAL PROBE NANOTOMOGRAPHY FOR INVESTIGATION OF THE STRUCTURE OF BIOMATERIALS AND CELLS

**O. I. Agapova<sup>a</sup>, A. E. Efimov<sup>a</sup>, L. A. Safonova<sup>a</sup>, M. M. Bobrova<sup>a</sup>,  
I. I. Agapov<sup>a, #</sup>, and Academician of the RAS S. V. Gautier<sup>a, b</sup>**

<sup>a</sup>*Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Sechenov University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: igor\_agapov@mail.ru*

Creation of new effective bio-artificial structures for tissue engineering and regenerative medicine requires development and implementation of new technological approaches for analysis of micro- and nanostructural features of constructs based on biomaterial cells and their interaction with cells. A new method of three-dimensional multiparametric analysis of nanostructure, scanning optical probe nanotomography, is presented in this paper, applied to the analysis of cells and biomaterials. Correlative reconstruction of fluorescent marker distributions and nanostructure features allows quantitative evaluation of a number of parameters of three-dimensional nanomorphology of fibroblasts and human hepatocarcinoma cells Hep-G2, adhered to biodegradable scaffolds based on silk fibroin. The developed technology with use of scanning optical probe nanotomography is applicable to investigation of three-dimensional micro- and nanostructure features of biomaterials and cells of different types.

*Keywords:* scanning probe nanotomography, fluorescence microscopy, fibroblasts, human hepatocarcinoma Hep-G2 cells, silk fibroin, biocompatible scaffolds

УДК 57.084. 1+578.74

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИГЕННОГО БЕЛКА ВПЧ6 L1 ДЛЯ ИНДУКЦИИ СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА, CD4 И CD8 Т ЛИМФОЦИТОВ, А ТАКЖЕ ГРАНЗИМА В В КРОВИ И СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АНОГЕНИТАЛЬНЫХ ПАПИЛЛОМАТОЗОВ

© 2021 г. Член-корреспондент РАН Р. К. Саляев<sup>a</sup>, Н. И. Рекославская<sup>a,\*</sup>

Поступило 22.04.2021 г.

После доработки 23.06.2021 г.

Принято к публикации 23.06.2021 г.

Антигенный белок ВПЧ6 L1 синтезирован в растительной экспрессионной системе трансгенных плодов томата при разработке пероральной вакцины против аногенитальных папилломатозов. В экспериментах по иммунизации мышей получены новые данные об индукции Т клеточного иммунного ответа, регистрируемые по результатам активации синтеза интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов, секретируемого ими гранзима В в периферических мононуклеарных клетках крови и спленоцитах мышей, предварительно вакцинированных вакцинным материалом плодов томата с геном HPV6 L1.

**Ключевые слова:** аногенитальные папилломатозы, ВПЧ6 L1, периферические мононуклеарные клетки крови (ПМКК), спленоциты, индукция синтеза интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов, секреция гранзима В

**DOI:** 10.31857/S2686738921050255

Папилломавирусы ВПЧ6 и ВПЧ11 являются субтипами низкого риска канцерогенеза человека, но характеризуются тем, что вызывают аногенитальные бородавки, ларингеальные папилломатозы, кондиломы *Condyloma acuminata* и др., давно известные как поражающие людей и причиняющие значительные неудобства в жизнедеятельности, снижая качество жизни и социальный статус человека. По данным ВОЗ аногенитальные папилломавирусы весьма широко распространены среди населения разных стран [1]. Кроме этого, папилломавирусы в ряду типов 11>6>16 ≠ 18 способны вызывать сложное мультигенное заболевание, именуемое возвратный (рецидивирующий) респираторный папилломатоз (RRP), впервые описанное у детей в возрасте 2–4 лет в XIX веке, протекающее внешне бессимптомно и с редкой смертностью, но неподдающееся лечению. RRP характеризуется генетической дисрегуляцией как минимум 100 генов иммунного ответа и апоптоза, что вызывает болезненную дисфункцию клеточного иммунитета (истощение макрофагов, иммунодефицит В и Т лимфоцитов и др.), и подавляющему эффективный клиринг и кон-

троль за инфекцией ВПЧ6 и ВПЧ11 [2]. Действие аногенитальных папилломавирусов на клеточный иммунитет мало изучено и поэтому недостаточно понятно.

Поскольку эти заболевания специфически связаны с изменениями в клеточном иммунном ответе при инфекции ВПЧ, целью нашей работы было оценить изменения клеточного иммунитета в результате перорального вакцинирования мышей вакцинным материалом плодов трансгенного томата с геном HPV6 L1 в сыворотке крови и спленоцитах. Так как ранее была установлена перекрестная реакция между филогенетически неродственным антигеном ВПЧ6 L1 и антителами к ВПЧ16 L1, ВПЧ18 L1, ВПЧ31 L1 и ВПЧ45 L1 [3], было важно определить, будет ли происходить подобное перекрестное взаимодействие при активации клеточного иммуногенеза.

В результате проделанной работы впервые показано весьма значительное возрастание содержания интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов, секретируемого ими фермента апоптоза гранзима В, которое предполагает возможность эффективной пероральной вакцинации с целью активации клеточного ответа в результате иммунизации мышей вакцинным материалом с белком ВПЧ6 L1 аногенитального типа, синтезированным в раститель-

<sup>a</sup> ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия  
<sup>\*</sup>e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru

ной экспрессионной системе плодов трансгенного томата.

В работе была использована генетическая конструкция с NPV6 L1, дизайн которой и синтез были опубликованы ранее [3]. Трансформация растений томата и синтез антигенного белка ВПЧ6 L1 также представлены в нашей предыдущей работе [3], посвященной разработке высокоэффективной экспрессионной системы на основе РНК зависимой РНК полимеразы (RdRP) вируса мозаики огурца CMV. Условия содержания лабораторных мышей и методика проведения вакцинации опубликованы ранее [4, 5].

Мыши для экспериментов были получены из вивария Восточно-Сибирского института медико-экологических исследований (г. Ангарск), работы с мышами были одобрены на заседании биоэтического совета СИФИБР СО РАН (протокол заседания № 9 от 30.10.2019 г.). При содержании мышей соблюдали стандартные условия, прописанные в ГОСТ 33215-2014, 33216-2014.

Мышей (беспородные самки возрасте 6 мес) перорально вакцинировали трижды с интервалом в один месяц вакцинным материалом плодов томата с геном NPV6 L1, при этом каждая мышь получала в среднем около 500 мкг ВПЧ6 L1. Через месяц после последней вакцинации у мышей брали кровь и выделяли селезенку. После сбора кровь до момента анализа содержали в специальных пробирках на 4 мл для хранения с напылением K2 + ЭДТА (Vacuum Blood Collection Tube, China) при  $-62^{\circ}\text{C}$  в низкотемпературном морозильнике. Селезенки помещали в среду DMEM в эппендорфы и на следующий день использовали для выделения спленоцитов.

Для анализа иммуногенности белка ВПЧ6 L1 использовали метод Элиспот, представляющий собой модификацию иммуноферментного анализа, позволяющий определять и количественно оценивать антиген-специфические Т лимфоциты, секретирующие определенный иммуноген, цитокин, например,  $\text{IFN}\gamma$  или фермент апоптоза гранзим В, локализованный в гранулах CD8 Т лимфоцитов. Для этого периферические мононуклеарные клетки крови (ПМКК) или спленоциты культивировали в присутствии антигена (индуктора) на нитроцеллюлозной мембране с адсорбированными первичными антителами, специфичными к исследуемому цитокину (или другому активатору). В результате стимуляции каждая антигенспецифическая клетка начинает продуцировать иммуноген, который связывается с иммобилизованными на мембране первичными антителами. После этого клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и секретируемые ими продукты определяли как окрашенные мелкие "пятна" (точки) на мембране с использованием конъюгированных с ферментом (щелочной фос-

фатазой) вторичных антител и хромогенного субстрата. Таким образом, методом Элиспот определяли количество восприимчивых к антигену иммуноген-секретирующих клеток в результате иммунной активации. Элиспот считается наиболее рекомендуемым методом для количественной оценки Т клеточного иммунного ответа при испытаниях вакцин.

В анализе использовали набор фирмы Abcam (UK) ab64029 – Murine  $\text{IFN}\gamma$  ELISPOT Kit (with precoated plates). Но ввиду большого количества Т лимфоцитов, выросших на мембранных дисках (диаметр 4 мм), которые трудно было просчитать, впоследствии был разработан модифицированный метод, использующий стерильные плоскостонные планшеты фирмы Corning Incorporated Costar 24 Well Cell Culture Plate Flat Bottom with Lid Tissue Culture Treated Non-Pyrogenic Polystyrene (USA) с диаметром дна лунок в 14 мм. В ламинар-боксе вырезали диски диаметром 12 мм нитроцеллюлозной мембраны Hybond™-C Extra (Membrane optimized for protein transfer) (Amersham Biosciences, UK) и помещали их на дно ячеек, в которые затем вносили по 300 мкл питательной среды DMEM (Биолот, Россия) и определенное количество микролитров суспензии периферического мононуклеарных клеток крови (ПМКК) или спленоцитов. В качестве индуктора ВПЧ6 L1 использовали 100 мкл супернатанта гомогената с ВПЧ6 L1, которые добавляли в среду DMEM перед внесением клеток крови или спленоцитов.

Спленоциты выделяли по ранее опубликованному методу [4, 5]. После измельчения селезенок полученные гомогенаты распределяли по эппендорфам и для обогащения фракции лимфоцитов центрифугировали 7 мин при  $4^{\circ}\text{C}$  и 700 об/мин. Жизнеспособность спленоцитов в супернатанте определяли с помощью 0.3% нитросинего тетразолия (Sigma, USA), а отсутствие мертвых клеток в препарате регистрировали с помощью 0.4% трипанового синего (Биолот, Россия). При подсчете (камера Горяева) с одной селезенки получали примерно  $10^7$ – $10^8$  клеток на мл (в объеме одного эппендорфа). Дальнейшую процедуру Элиспот, включающую инкубации с антителами и промывание дисков буфером, осуществляли по протоколу набора фирмы Abcam.

В анализе Элиспот использовали следующие специфические антитела фирмы Abcam: первичные – Anti-Interferon gamma antibody recombinant rabbit monoclonal [EPR1108] ab133566; Anti-CD4 antibody [EPR19514] ab183685 recombinant rabbit monoclonal; Anti-CD8 alpha antibody [EPR21769] ab217344 recombinant rabbit monoclonal; Anti-Granzyme B antibody ab53097 rabbit polyclonal; вторичные – Goat Anti-mouse IgG H&L (Alkaline Phosphatase) ab97020. В качестве субстрата брали таблетки (0.3–0.5 таблетки на 1 анализ в 1 план-

шете) SIGMAFAST™ BCIP®NBT (Sigma, USA) в буфере 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Трис-HCl, pH 9.5. Окрашивание наблюдали в течение 20–30 мин, после чего диски фиксировали на листе белой бумаги и фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата. Подсчет количества окрашенных “пятен” клеток осуществлялся по фотографиям на дисплее компьютера при необходимом увеличении. Окрашенное “пятно” клеток, т.е. “пятно” – образующая единица или Т клеточное “пятно”, как полагают [6], является клоном одной клетки, секретирующей индуцируемый специфический цитокин (иммуноген).

На первом этапе исследования изучали действие ВПЧ6 L1 на индукцию синтеза интерферона в клетках крови (ПМКК) и спленоцитах при разном количестве вносимой суспензии клеток в среду DMEM. Выяснилось, что нет различий в количестве прореагировавших “пятен”, т.е. выросших из Т клеток, вносимых в исходно в разной концентрации. Например, при разведении суспензий ПМКК в 5, 15, 30, 50, 70 и 100 мкл число “пятен” составило соответственно: 476 ± 60, 438 ± 18, 574 ± 70, 409 ± 11, 478 ± 14, 161 ± 0. При разведении суспензий спленоцитов в тех же количествах мкл количество “пятен” составило соответственно: 504 ± 34, 613 ± 65, 723 ± 17, 664 ± 12, 704 ± 8, 620 ± 116. В дальнейших экспериментах в лунки вносили по 30 мкл суспензий ПМКК или спленоцитов, опираясь на число “пятен” при подсчете.

На рис. 1 представлен анализ Элиспот, выполненный в точном соответствии с набором фирмы Abcam (UK) ab64029 – Murine IFN $\gamma$  ELISPOT Kit. В лунки планшета (Медполимер, Санкт-Петербург) с помещенными на дно нитроцеллюлозными дисками (диаметр 4 мм) вносили суспензии ПМКК или спленоцитов в среде DMEM с антибиотиками в объеме 100 мкл, которые содержали примерно 10<sup>5</sup> клеток и индуктор антигенный белок ВПЧ6 L1 (100 мкг) в соответствии с прописью фирмы Abcam. За этот период в течение трех суток размножилось на дисках довольно большое количество Т лимфоцитов, продуцирующих интерферон, лиганды CD4 и CD8 Т лимфоцитов, секретирующих гранзим В и клеток, прореагировавших с соответствующими коммерческими антителами. Как видим, произошла значительная индукция синтеза интерферона, Т лимфоцитов с лигандами CD4 и CD8. По результатам предварительного подсчета их количество приближалось к числу 300–700 клеток (“пятно”-образующих единиц) на диск. В ряде контрольных дисков обнаруживаются прореагировавшие с антителами “пятна” клеток, но их количество составляло примерно 10–20 на диск. Представленные на рис. 1 данные дают основание полагать, что антигенный белок ВПЧ6 L1 способен в высокой степени

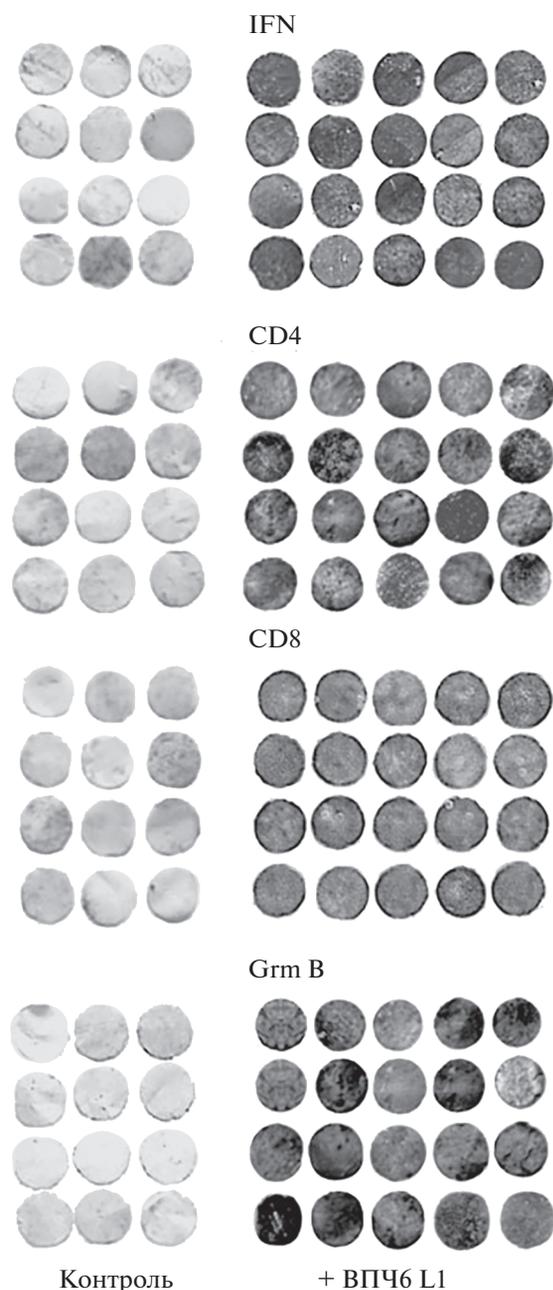
активировать Т клеточный иммуногенез и вызывать индукцию синтеза интерферона, CD4, CD8 Т лимфоцитов, секретирующих значительные количества фермента апоптоза гранзима В.

Для того чтобы изучить индукцию синтеза Т клеток (Т клеточных “пятен”), использовали нашу модификацию метода Элиспот с увеличенной площадью нитроцеллюлозной мембраны для пролиферации Т клеток (рис. 2). При этом вначале использовали в качестве релевантного (контрольного и неиндукционного) белка бычий сывороточный альбумин (БСА), 3% раствор которого вносили в количестве 300 мкл в лунки планшета с 24 ячейками. Как видно из рис. 2, БСА не индуцировал синтез Т лимфоцитов.

Можно видеть, что увеличение площади нитроцеллюлозной мембраны, по-видимому, было благотворным для роста Т лимфоцитов и их жизнедеятельности, так как клеткам было достаточно пространства для пролиферации в виде единичных колоний, хорошо различимых визуально. Общеизвестно, что во взрослом организме содержится примерно 10<sup>11</sup> моноцитов и макрофагов, высокопластичных, не имеющих специфичности предшественников лимфоцитов. Около 4 млрд Т лимфоцитов, большей частью “наивных”, т.е. “незаряженных” антигенами, свободно циркулируют в лимфе, в крови или депонируются в селезенке. Но при инфекции и последующем воспалении в очаге (например, под нарывом) скапливаются до 1 трлн Т лимфоцитов, продуцирующих интерферон и другие цитокины, активированные для борьбы с инфекцией, причем эта противовоспалительная активация происходит в считанные часы.

Очевидно, иммунные клетки быстро растут на питательной среде DMEM, а 10–30 мкл суспензии достаточно для осуществления успешного размножения праймированных Т-лимфоцитов. Повышение дозы засеваемой суспензии приводит к снижению скорости роста из-за контактного торможения и недостатка места для пролиферации. Следует отметить, что по истечении суммарного срока всех инкубаций (примерно 7 сут) спленоциты и ПМКК все еще оставались живыми, помещенными в среду DMEM.

Из рис. 3 можно видеть, что наряду с активацией синтеза интерферона спленоциты мышей в присутствии ВПЧ6 L1 были способны формировать большие количества CD4 Т лимфоцитов и CD8 Т лимфоцитов, которые секретируют значительные количества фермента апоптоза гранзима В из внутриклеточных гранул (рис. 3). В рисунке в крайнем положении справа помещен нитроцеллюлозный диск варианта CD8, на котором выросло 2584 “пятен” клеток, хорошо различимых на фотографии и достаточно легко просчитываемых при большом увеличении на дисплее компьютера.



**Рис. 1.** Элиспот анализ индукции синтеза интерферона (IFN), CD4 и CD8 Т лимфоцитов, гранзима В (Grm B) при действии антигенного белка оболочки L1 папилломавируса аногенитального типа VP46 L1 в клетках крови (ПМКК) вакцинированных VP46 L1 мышей. Описание использованных в анализе коммерческих антител к IFN, CD4, CD8 Т лимфоцитам и гранзиму В приведены в тексте. Вариант Контроль – контроль без внесения индуктора VP46 L1 в среду DMEM, вариант + VP46 L1 – опыт с внесением индуктора VP46 L1 в среду DMEM.

В наших предыдущих работах было показано, что антигенный белок VP46 L1 способен взаимодействовать с антителами филогенетически неродственных типов папилломавирусов типов 16,

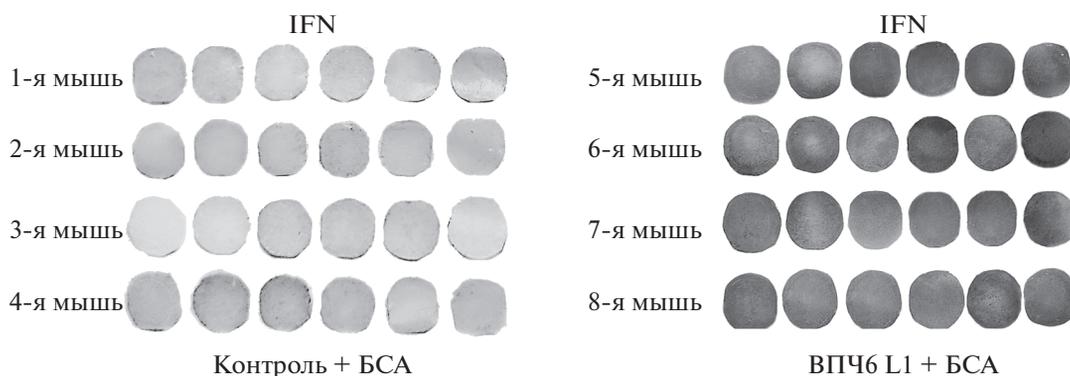
18, 31 и 45 [3, 5]. Оказалось, что антигенный белок VP46 L1 также способен активировать Т клеточный иммуногенез у этих филогенетически неродственных типов 16, 18, 31 и 45 (табл. 1), так как в клетках крови (ПМКК), растущих на мембранных дисках, значительно проявилась окраска клеток с антителами на интерферон, CD4 и CD8 Т лимфоциты.

Инфицирование субтипами папилломавирусов низкого риска канцерогенеза VP46 и VP411, как полагают [2, 7], приводит к наиболее известным аногенитальным дисплазиям и к рецидивирующему (возвратному) респираторному папилломатозу. В дополнение к этому VP46 и VP411 ассоциируются с широким кругом достаточно агрессивных карцином: гортани, легких, языка, отоларингических новообразований, а также с дисплазией цервикса низкой и средней степени. Эти инфекционные заболевания трудно поддаются излечению (возврат к росту опухолей на 80% после комбинаторных способов лечения, включая хирургию, радиотерапию и химиотерапию), поэтому для их искоренения предполагают использовать многофазовые, мультикомпонентные схемы.

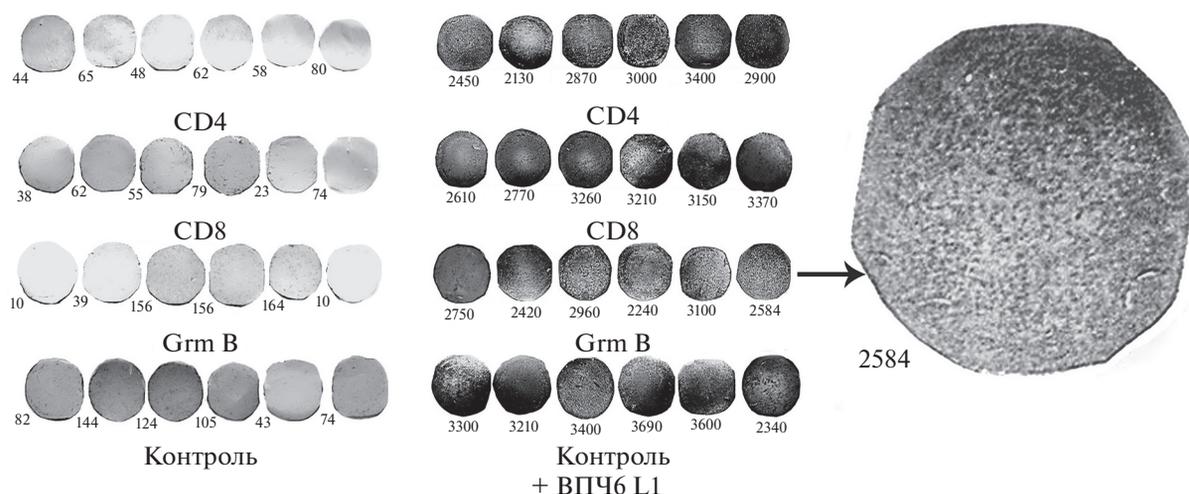
Одной из причин утраты устойчивости к инфекциям является “истощение” Т лимфоцитов, приводящее к разнообразным дисфункциям иммунной системы, иммунным заболеваниям, иммунодефицитам, опухолеобразованию и др. Поэтому необходимо искать инновационные пути усиления клеточного ответа для борьбы с инфекциями и иммунодефицитами.

В настоящей работе впервые показано, что антигенный белок аногенитального типа папилломавируса VP46 L1 способен активировать Т клеточный ответ в периферических клетках крови и спленоцитах, при этом значительно увеличивается количество клеток, синтезирующих интерферон, весьма возрастает число Т лимфоцитов с лигандами CD4 и CD8, активизируется секреция из гранул CD8 лимфоцитов фермента апоптоза гранзима В. Для получения этих результатов в нашей работе был применен метод Элиспот, модифицированный и значительно удешевляющий анализ по сравнению с зарубежными наборами. В зависимости от фирмы цена стандартного набора Элиспот составляет 90 000–100 000 рублей. Предложенная нами модификация анализа Элиспот требует затрат примерно в 10 раз меньше по сравнению с зарубежными аналогами, что позволяет осуществлять серийные анализы активации вакцинами иммунных ответов.

Известно, что Т клетки исключительно чувствительны к антигенной стимуляции, так как они могут уничтожить чужеродные структуры, пролиферировать и продуцировать цитокины в ответ на антигенпредставляющие клетки, приво-



**Рис. 2.** Изучение методом Элиспот действия БСА и ВПЧ6 L1 на индукцию синтеза интерферона (IFN) в спленocyтaх мышей, вакцинированных ВПЧ6 L1. Для анализа в вариантах использовали спленocyтaты восьми индивидуальных мышей. БСА – бычий сывороточный альбумин. Вариант Контроль + БСА – контроль без внесения ВПЧ6 L1 в среду DMEM и с добавлением БСА, вариант + ВПЧ6 L1 + БСА – внесены ВПЧ6 L1 и БСА одновременно.



**Рис. 3.** Изучение методом Элиспот индукции синтеза интерферона (IFN), CD4 и CD8 Т лимфоцитов в спленocyтaх вакцинированных ВПЧ6 L1 мышей, а также индукции секреции фермента апоптоза гранзима В (Grm В) из гранул CD8 Т лимфоцитов. Обозначения: Контроль – контроль без индукции, + ВПЧ6 L1 – опыт, в котором внесен антигенный белок ВПЧ6 L1 для индукции активации Т лимфоцитов и секреции гранзима В. Стрелкой показан отдельный нитроцеллюлозный диск (вариант CD8) (крайний справа), на котором выявлены “пятна” клеток в просчитанном количестве 2584, прореагировавшие с антителами на CD8 Т лимфоцитов.

для к образованию многочисленных комплексов гистосовместимости (МНСI и МНСII). Несмотря на то что антигенный белок ВПЧ16 L1, используемый в вакцинах Гардасил, Церварикс и Гардасил-9, охарактеризован как профилактический компонент, дальнейшие более детальные исследования показали, что ВПЧ16 L1 может вызывать также индукцию образования и накопление CD4 и CD8 Т лимфоцитов и активировать аутолиз аутологических клеток первичных опухолей цервикакса, появившихся после инфекции онкогенным папилломавирусом ВПЧ16 [8]. По-видимому, судя по нашим данным [3] и данным других исследователей, если происходит индукция синтеза антител в присутствии индуктора высокоим-

муногенного белка ВПЧ6 L1, то вполне вероятно, что при этом активируется и более полный Т клеточный иммуногенез, т.е. активация В лимфоцитов происходит одновременно с активацией и Т лимфоцитов.

Остановка активируемой регрессии опухолей индукторным антигеном, возможно, вызвана торможением белковыми ингибиторами контрольных точек (ИКТИ), которые уже обнаружены в большом количестве в организмах млекопитающих. Это предполагает, что клеточный иммунный ответ, формируемый данным вирусным антигеном, может иметь также и терапевтическое действие на опухоли и вызывать их регрессию впоследствии [6, 7]. Показано, что наличие или

**Таблица 1.** Индукция синтеза интерферона, CD4 и CD8 Т лимфоцитов антигенным белком ВПЧ6 L1 в крови (ПМКК) мышей, вакцинированных вакцинным материалом плодов томата с филогенетически неродственными типами папилломавирусов ВПЧ L1 16, 18, 31 и 45

Тип ВПЧ L1	Контроль			Опыт		
	IFN*	CD4*	CD8*	IFN*	CD4*	CD8*
16	128	108	72	1980, 1800, 1220	1120, 1182, 1230	1980, 2016, 1186
18	98	78	76	1240, 1450, 1560	1840, 1684, 1208	1360, 2000, 1820
31	240	132	208	1160, 1950, 1420	1760, 1620, 1800	1185, 1560, 1670
45	204	15	36	1680, 1720, 1850	1860, 1840, 1380	1960, 1820, 1920

\*IFN, CD4, CD8 – использованы антитела к IFN $\gamma$ , лигандам CD4 и CD8 Т лимфоцитов.

экспрессия даже ограниченного количества вирусного антигена L1 может послужить как триггер терапевтического действия и индуцировать гуморальный и цитотоксичный клеточные ответы, как на опухолях у пациентов [8], так и на моделях мышей [9].

Например, показано [10], что комбинация назального вакцинирования вакциной на основе комплекса малоразмерных пептидов ВПЧ E6 и E7 и белковых ингибиторов контрольных точек иммунитета (ИКТИ) приводила к значительной регрессии быстрорастущих агрессивных ротовых опухолей (орофаринкса, ротоглотки), имплантированных модельным мышам [10]. Как полагают авторы, успешность регрессии была обусловлена сочетанным и кумулятивным действием (комбинацией), вызывающим высокородственную и высокоэффективную индукцию специфического Т клеточного иммунного ответа пептидной вакциной и модальностью (модуляцией чувствительности, восприимчивости опухолевых клеток) белковых ингибиторов контрольных точек иммунного ответа. По отдельности вакцинный пептидный материал ВПЧ E6/E7 или белковые ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКТИ) такой успешной регрессии не оказывали. По всей вероятности, вакцины на основе папилломавирусных высокоиммуногенных белков могли бы быть препаратами-партнерами для ИКТИ, которые при совместном действии усиливали бы противоопухолевую эффективность. Как известно, препараты из группы ИКТИ не запускают индукцию иммунного ответа “с нуля”: они лишь “растормаживают” уже иницированную иммунную реакцию, но “остановленную” белками контрольных точек [11]. Поэтому сейчас ведется направленный интенсивный поиск иммуногенных веществ, лизатов, вакцин, костимуляторных молекул, цитокинов и других компонентов иммунотерапии, которые в сочетании с ИКТИ преодолели бы контрольные точки иммунитета и оказали высокоэффективное противоопухолевое действие, вызывая регрессию. Наибольшего успеха достигли персонифицированные противораковые вакцины, т.е. разработанные с

учетом индивидуальной восприимчивости опухолевых клеток определенного пациента, например, для усиления миграции Т лимфоцитов (киллеров) внутри опухоли и т.д. Полагают, что и для папилломавирусных инфекций типа кондилом, рецидивирующих дыхательных папилломатозов следует также применять “персонифицированный”, т.е. высокоспецифичный индивидуальный подход.

В случае аногенитальных папилломатозов мог бы быть прогрессивным подход для разработки вакцины с иммуногенным белком ВПЧ6 L1 и специфическим ингибитором контрольных точек иммунного ответа, тем более, что наблюдается перекрестная реакция между филогенетически неродственными типами папилломавирусов. Исследования, развиваемые в этом направлении, могли бы привести к разработке унифицированной терапевтической вакцины против папилломавирусной инфекции и против опухолеобразования, опосредованного ВПЧ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bruni L., Albero G., Serrano B. et al.* // ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and related Diseases in the World. Summary Report WHO 17 June 2019. WORLD. 306 pp.
2. *Bonagura V.R., Hatam L.J., Rosenthal D.W. et al.* // APMIS. 2010. V.118. P. 455–470.
3. *Рекославская Н.И., Саляев Р.К., Столбиков А.С.* // Доклады Российской Академии Наук. Науки о Жизни. 2021. Т. 498. С. 57–63.
4. *Саляев Р.К., Рекославская Н.И., Столбиков А.С.* // Российские нанотехнологии. 2020. Т. 15. С. 132–138.
5. *Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S.* // Doklady Biochemistry Biophysics. 2019. V. 488. P. 316–319.

6. Потеряев Д.А., Хамитов Р.А., Ефимов Г.А., Шустер А.М. // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2020. Т. 20. С. 144–158.
7. Shin T.H., Pankhong P., Yan J., Khan A.S. et al. // Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2021. V. 8. P. 470–478.
8. Belone S., El-Sahwi K., Cocco E., Casagrande F. et al. // J. of Virol. 2009. V. 83. P. 6779–6789.
9. Paz De la Rosa G., Monroy-Garcia A., de Lourdes Mora-Garcia M. et al. // Virol. Journal. 2009. V. 6. P. 1–11.
10. Dorta-Estremera S., Chin R.L., Sierra G. et al. // Cancer Res. 2018. V. 78. P. 5327–5339.
11. Шубникова Е.В., Букатина Т.М., Вельц Н.Ю. и др. // Безопасность и риск фармакотерапии. 2020. Т. 8. С. 9–22.

**THE USE OF THE ANTIGENIC PROTEIN HPV6 L1  
TO INDUCE THE SYNTHESIS OF INTERFERON,  
CD4 AND CD8 T LYMPHOCYTES AND GRANZYME B IN BLOOD  
AND SPLENOCYTES OF MICE IN ORDER TO DEVELOP A BROAD VACCINE  
AGAINST ANOGENITAL PAPILOMATOSES**

**Corresponding Member of the RAS R. K. Salyaev<sup>1</sup> and N. I. Rekoslavskaya<sup>1,#</sup>**

<sup>1</sup> *The Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the RAS, Irkutsk, Russian Federation*  
<sup>#</sup> *e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru*

The antigenic protein HPV6 L1 was synthesised in the plant expression system based on transgenic tomato fruit during the development of the oral vaccine against anogenital papillomaviruses. In experiments on the mice immunization, there were obtained new data about the induction of the T cell immune response, according to results of the activation of the synthesis of interferon, CD4 and CD8 T lymphocytes secreted by them of granzyme B in periferic mononuclear blood cells and splenocytes of mice which were previously vaccinated by vaccine material of tomato fruit with the gene hpv6 L1.

*Keywords:* anogenital papillomatoses, HPV6 L1, periferic mononuclear blood cells (PMBC), splenocytes, the induction of the synthesis of interferon, CD4 and CD8 T lymphocytes, the secretion of granzyme B