

СОДЕРЖАНИЕ

Том 505, 2022

- Экспрессия CASC8 РНК в клеточных культурах рака поджелудочной железы человека
О. Ю. Буренина, Н. Л. Лазаревич, И. Ф. Кустова, Т. С. Зацепин, М. П. Рубцова, О. А. Донцова 253
- Экспрессия гена *HMA2* в листьях интрогрессивных линий пшеницы в условиях оптимального содержания цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците
Н. М. Казнина, Н. И. Дубовец, Н. С. Репкина, Ю. В. Батова, А. А. Игнатенко, О. А. Орловская, А. Ф. Титов 258
- Анксиолитическое действие пептидов морской анемоны *Heteractis crispa*, модуляторов TRPV1 и ASIC каналов
О. В. Синцова, Р. С. Калина, И. Н. Гладких, Ю. А. Паликова, В. А. Паликов, Н. А. Бороздина, А. А. Климович, А. С. Меньшов, И. А. Дьяченко, Е. В. Лейченко 263
- Противоопухолевые свойства водных экстрактов из мицелия *Inonotus rheades* и их оценка при различных условиях культивирования
Г. Б. Боровский, Т. Г. Горноста́й, М. С. Полякова, Е. А. Лозовская, С. Б. Никифоров 271
- Наноконструкция на основе ядра природного клиноптилолита и оболочки фосфатидилхолина
А. Г. Погорелов, А. И. Панаит, А. А. Гулин, А. А. Станкевич, В. Н. Погорелова, Г. Р. Иваницкий 277
- Факторы риска и механизмы развития сердечно-сосудистых заболеваний при моделировании посттравматического стрессового расстройства у крыс вистар в зависимости от устойчивости к стрессу и возраста
М. В. Кондашевская, В. Э. Цейликман, М. В. Комелькова, П. Н. Попков, М. С. Лапшин, П. О. Платковский, О. Б. Цейликман, С. А. Федоров, М. В. Черешнева, В. А. Черешнев 281
- Иммуногематологические параметры эктотермных амфибионтов фауны среднего Урала: сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870, Caudata) и озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771, Anura)
Л. А. Ковальчук, Л. В. Черная, В. А. Мищенко, Д. Л. Берзин, В. Н. Большаков 288
- Находка зубов архаичной полевки *Lasiopodomys (Stenocranius) gregaloides* (Hinton, 1923) (Mammalia, Rodentia, Cricetidae) в позднем плейстоцене Южного Урала
Т. В. Фадеева, П. А. Косинцев, Д. О. Гимранов, А. Г. Яковлев 294
- Стрессы растений и аллелотоксичность почв
Б. И. Сандухадзе, Г. Н. Федотов, Н. В. Давыдова, Р. З. Мамедов, В. А. Нардид, И. В. Горепекин, М. С. Крахмалёва, Д. И. Потапов, А. О. Казаченко, Е. В. Савинов, Т. А. Грачева 298
- Первый дипептидный миметик нейротрофина-3: дизайн и фармакологические свойства
Т. А. Гудашева, Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, И. О. Логвинов, Т. А. Антипова, Д. М. Никифоров, П. Ю. Поварнина, С. Б. Середенин 303

Строение мозга мельчайшего жесткокрылого <i>А. А. Макарова, А. А. Полилов</i>	310
Влияние акустико-механического воздействия на репродуктивные качества спермы осетровых рыб при криоконсервации <i>Е. Н. Пономарева, М. М. Беляя, А. В. Фирсова, А. А. Красильникова</i>	314
Вариабельный сайт CTCF из интрона гена <i>Ubx Drosophila melanogaster</i> является избыточным и не имеет инсуляторной активности <i>А. Н. Ибрагимов, О. В. Былино, О. В. Кырчанова, Ю. В. Шидловский, R. White, P. Schedl, П. Г. Георгиев</i>	318
Изменение экспрессии гена <i>gapdh</i> в органах мышей, нокаутных по гену <i>insrr</i> <i>Е. А. Ганцова, А. А. Гавриленкова, О. В. Серова, И. Е. Деев</i>	322

CONTENTS

Vol. 505, 2022

Expression of CASC8 RNA in Human Pancreas Cancer Cell Lines <i>O. Y. Burenina, N. L. Lazarevich, I. F. Kustova, T. S. Zatsepin, M. P. Rubtsova, and O. A. Dontsova</i>	253
The <i>HMA2</i> Gene Expression in Leaves of Introgressive Wheat Lines under Zn Optimum and Deficiency Content in Root Environment <i>N. M. Kaznina, N. I. Dubovets, N. S. Repkina, Yu. V. Batova, A. A. Ignatenko, O. A. Orlovskaya, and A. F. Titov</i>	258
Anxiolytic Effect of Peptides from Sea Anemone <i>Heteractis crista</i> , Modulators of TRPV1 and ASIC Channels <i>O. V. Sintsova, R. S. Kalina, I. N. Gladkikh, Y. A. Palikova, V. A. Palikov, N. A. Borozdina, A. A. Klimovich, A. S. Menshov, I. A. Dyachenko, and E. V. Leychenko</i>	263
Antitumor Properties of Aqueous Extracts from <i>Inonotus rheades</i> Mycelium and their Evaluation under Various Cultivation Conditions <i>G. B. Borovskii, T. G. Gornostai, M. S. Polyakova, E. A. Lozovskaya, and S. B. Nikiforov</i>	271
Natural Clinoptilolite Nano Particles Coated with Phosphatidylcholine <i>A. G. Pogorelov, A. I. Panait, A. A. Gulin, A. A. Stankevich, V. N. Pogorelova, and G. R. Ivanitskii</i>	277
Risk Factors and Pathogenetic Mechanisms of Cardiovascular Diseases in Posttraumatic Stress Disorder Model in Wistar Rats Depending on Stress Resistance and Age <i>M. V. Kondashevskaya, V. E. Tseilikman, M. V. Komelkova, P. N. Popkov, M. S. Lapshin, P. O. Platkovskii, O. B. Tseilikman, S. A. Fedorov, M. V. Chereshneva, and V. A. Chereshnev</i>	281
Immunohematological Parameters of Ectothermal Amphibians of the Fauna of the Middle Urals: Siberian Salamander (<i>Hynobius keyserlingii</i> Dybovsky, 1870, Caudata) and Lake Frog (<i>Pelophylax ridibundus</i> Pallas, 1771, Anura) <i>L. A. Kovalchuk, L. V. Chernaya, V. A. Mishchenko, D. L. Berzin, and V. N. Bolshakov</i>	288
The Finding of Molars of the Archaic Vole <i>Lasiopodomys (Stenocranius) gregaloides</i> (Hinton, 1923) (Mammalia, Rodentia, Cricetidae) in the Late Pleistocene of the Southern Urals <i>T. V. Fadeeva, P. A. Kosintsev, D. O. Gimranov, and A. G. Yakovlev</i>	294
Plant Stresses and Allelotoxicity of Soils <i>B. I. Sandukhadze, G. N. Fedotov, N. V. Davydova, R. Z. Mamedov, V. A. Nardid, I. V. Gorepekin, M. S. Krakhmaleva, D. I. Potapov, A. O. Kazachenko, E. V. Savinov, and T. A. Gracheva</i>	298
The First Dipeptide Mimetic of Neurotrophin-3: Design and Pharmacological Properties <i>T. A. Gudasheva, N. M. Sazonova, F. V. Tarasiuk, I. O. Logvinov, T. A. Antipova, D. M. Nikiforov, P. Yu. Povarnina, and S. B. Seredenin</i>	303
Structure of the Brain of the Smallest Coleoptera <i>A. A. Makarova and A. A. Polilov</i>	310

Influence of Acoustic-mechanical Impact on the Reproductive Qualities
of Sturgeon Sperm During Cryopreservation

E. N. Ponomareva, M. M. Belaya, A. V. Firsova, and A. A. Krasilnikova

314

The Variable CTCF site from *Drosophila melanogaster* *UBX* Gene is Redundant
and has no Insulator Activity

A. N. Ibragimov, O. V. Bylino, O. V. Kyrchanova, Y. V. Shidlovskii, R. White, P. Schedl, and P. G. Georgiev

318

Changes in the Expression of the *gapdh* Gene in the Organs of insrr Knockout Mice

E. A. Gantsova, A. A. Gavrilenkova, O. V. Serova, and I. E. Deyev

322

УДК 518.218

ЭКСПРЕССИЯ CASC8 РНК В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. О. Ю. Буренина^{1,*}, Н. Л. Лазаревич^{2,3}, И. Ф. Кустова², Т. С. Зацепин⁴, М. П. Рубцова⁴, академик РАН О. А. Донцова^{1,4}

Поступило 13.04.2022 г.

После доработки 04.05.2022 г.

Принято к публикации 04.05.2022 г.

Многие длинные некодирующие РНК (днРНК) экспрессируются в клетках человека в виде набора транскриптов, имеющих разную длину и состав экзонов. В случае ассоциированных с раком днРНК актуальной задачей является определение их конкретных изоформ, поскольку каждый транскрипт может выполнять собственную функцию при канцерогенезе и иметь уникальный профиль экспрессии в различных типах опухолей. Мы впервые проанализировали экспрессию днРНК CASC8 в клеточных линиях протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека и обнаружили, что в данном типе рака преобладает изоформа, ранее считавшаяся минорной. Мы также выявили крайне высокий уровень экспрессии всех транскриптов CASC8 в клетках MIA PaCa-2, и, наоборот, отсутствие этой днРНК в линии PANC-1, что позволит использовать их как удобные модели для дальнейших исследований *in vitro*.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК, CASC8, рак поджелудочной железы

DOI: 10.31857/S2686738922040035

Рак поджелудочной железы (преимущественно протоковая аденокарцинома, PDAC, от англ. “pancreatic duct adenocarcinoma”) является наиболее летальным среди злокачественных новообразований. Практически бессимптомное развитие и позднее выявление опухоли обуславливают крайне низкую выживаемость пациентов, которая в среднем в течение 5 лет не превышает 7%, а частота рецидивов после хирургического лечения или химиотерапии крайне высока [1]. На сегодняшний день для диагностики и прогнозирования развития PDAC в клинической практике используется только онкомаркер СА 19-9, определяемый в сыворотке крови. Однако область его

применения крайне ограничена ввиду низкой чувствительности и специфичности, поскольку его повышение наблюдается и при других опухолях пищеварительной системы, а также при неопухолевых патологиях [2]. Перспективным направлением считается использование в качестве онкомаркеров длинных некодирующих РНК (днРНК), которые могут быть напрямую измерены в биологических жидкостях, биоптате или постоперационных тканях с помощью ПЦР с обратной транскрипцией с детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) [3]. На сегодняшний день известно несколько десятков днРНК, уровень экспрессии которых меняется при PDAC [4, 5], однако большинство из них – “универсальные” онкогенные днРНК, такие как MALAT1, ANRIL, H19, UCA1 и др. Более тканеспецифичные для поджелудочной железы или, в целом, для органов пищеварительной системы днРНК, как правило, имеют низкие уровни экспрессии, что лимитирует возможность их использования в клинической практике, а также затрудняет научные исследования с целью выяснения их свойств и функций. Таким образом, актуальной задачей является идентификация новых днРНК, экспрессия которых активируется в PDAC по сравнению со здоровыми тканями поджелудочной железы.

В ходе предварительного анализа доступных биоинформатических данных TCGA (The Cancer

¹ Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² НИИ канцерогенеза ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина” Министерства здравоохранения, Москва, Россия

³ Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Химический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: alunit@inbox.ru

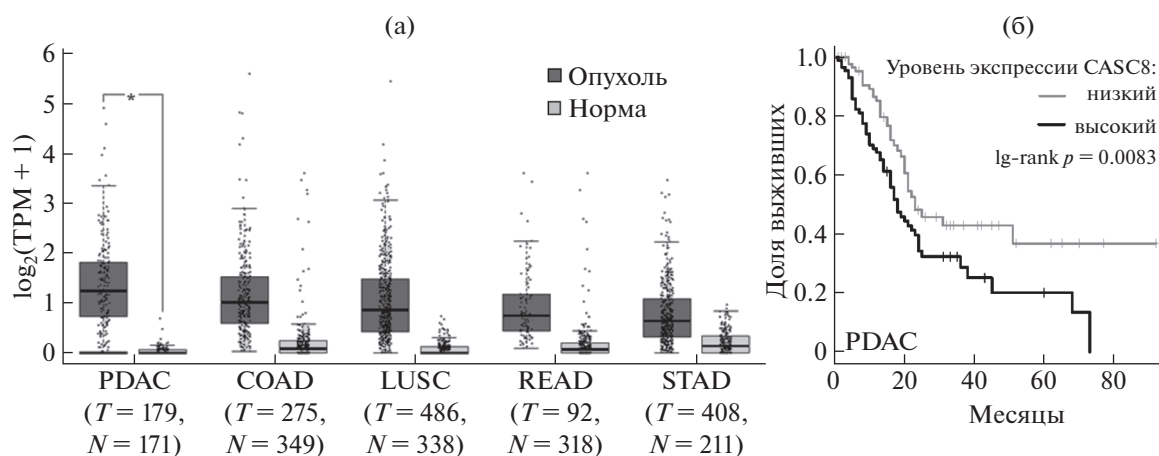


Рис. 1. Экспрессия CASC8 при различных онкологических заболеваниях по данным онлайн сервера GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, www.gepia.cancer-pku.cn) (а) Топ-5 опухолей с максимальной экспрессией CASC8 по сравнению со неопухолевыми тканями. Усредненные данные TCGA по количеству образцов: T – опухоль, N – норма. PDAC – протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, COAD – аденокарцинома толстой кишки, LUSC – плоскоклеточный рак легкого, READ – аденокарцинома прямой кишки, STAD – аденокарцинома желудка. (б) Общая выживаемость (кривая Каплана–Мейера) пациентов с PDAC в группах с высоким ($n = 88$) и низким ($n = 88$) уровнем экспрессии CASC8 в постоперационных опухолевых образцах.

Genome Atlas) мы обнаружили малоизученную днРНК CASC8 (от англ. “Cancer Susceptibility Candidate 8”), существенная активация экспрессии которой наблюдается при раке органов желудочно-кишечного тракта и легких (рис. 1а), а ее максимальная экспрессия замечена в случае PDAC при практически полном отсутствии этой днРНК в нормальных тканях поджелудочной железы. Данные различия являются статистически значимыми, позволяя предсказать диагностический потенциал CASC8 (рис. 1а). Высокая смертность пациентов с повышенным уровнем экспрессии CASC8 (рис. 1б) указывает на ее возможную проонкогенную роль и позволяет рассматривать эту днРНК и в качестве потенциального прогностического биомаркера.

Тем не менее большинство опубликованных научных работ о CASC8 носит аналитический характер и посвящено установлению корреляции отдельных нуклеотидных полиморфных замен в ее гене с рисками развития различных типов рака [6]. Попытки выявить функциональную роль самой днРНК CASC8 были проведены лишь в нескольких экспериментальных исследованиях. Было показано, что экспрессия CASC8 в клетках ретинобластомы способствует снижению уровня опухолесупрессорной miR-34a и последующему усилению пролиферативной активности [7]. В случае немелкоклеточного рака легкого подавление экспрессии CASC8 приводило к ингибированию пролиферации клеток, их способности к инвазии, миграции и колониеобразованию, а также повышало их чувствительность к осимертинибу [8]. В работе [9] было продемонстрировано, что

подавление экспрессии CASC8 в PDAC приводит к активации miR-129-5p и ингибированию мРНК *TOB1*, однако биологическая значимость данного влияния, как и функция *TOB1* при канцерогенезе, не выяснена.

Мы обнаружили, что во всех исследованиях было полностью проигнорировано существование четырех различных изоформ CASC8, аннотированных в базах данных (Ensembl, NCBI, USCS). Причем в работе 2014 г. [10] были проведены эксперименты по определению 5'- и 3'-концов всех транскриптов CASC8 с помощью метода RACE (от англ. “Rapid Amplification of cDNA Ends”) в клетках рака толстой кишки. Исходя из полученных результатов (рис. 2а) можно сделать вывод, что продукты экспрессии гена *CASC8* представлены протяженным транскриптом (*i1*), состоящим из трех первых экзонов, и двумя короткими изоформами: *i2* содержит экзоны 5, 6 и 7, а *i3* – экзоны 5 и 7. Изоформа *i1a* по данным [10] не экспрессируется и, вероятно, является результатом аннотирования предшественника днРНК. При этом транскрипты *i1* и *i2/i3* не имеют общих экзонов, т.е. представляют собой две совершенно разные днРНК. Примечательно, но во всех ранее опубликованных работах про CASC8 при проведении ОТ-ПЦР использовали праймеры, комплементарные экзонам 1-3, т.е. специфичные для *i1*. При этом согласно доступной информации из базы данных UCSC, данная изоформа практически отсутствует в тканях PDAC. Таким образом, целью данной работы являлись идентификация различных изоформ CASC8 днРНК в клеточных культу-

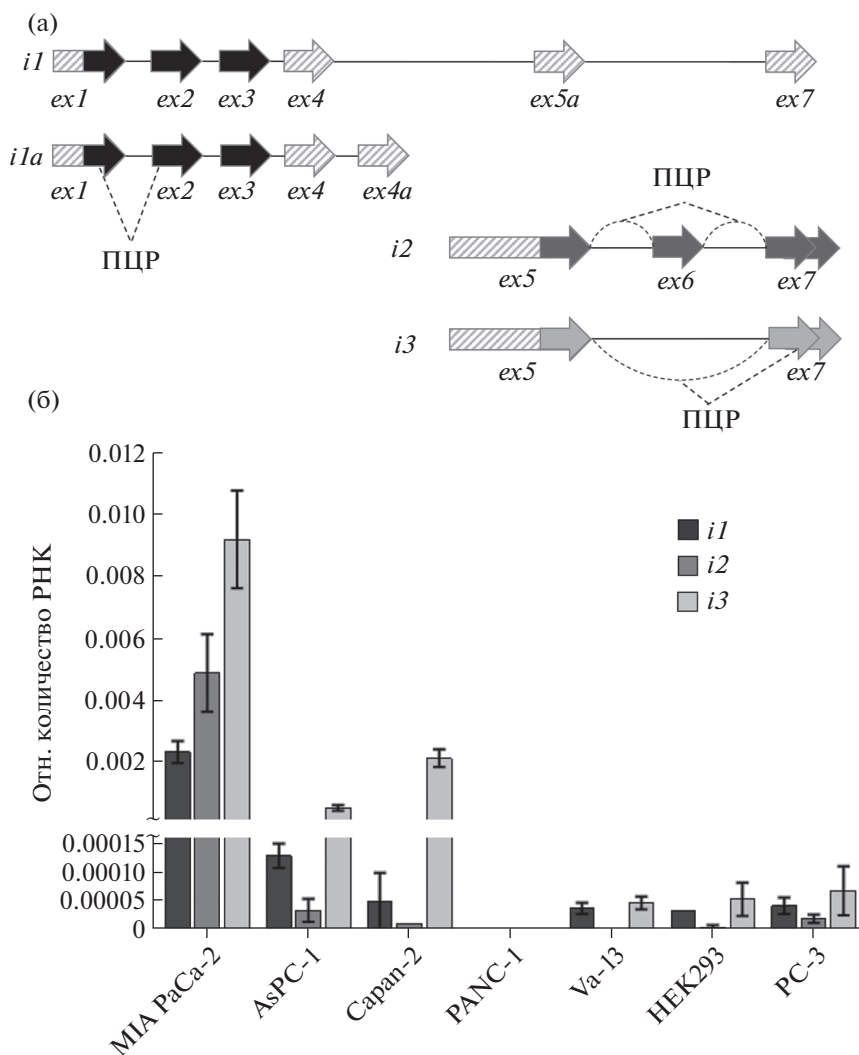


Рис. 2. Сравнительный анализ относительной экспрессии (ОТ-ПЦР) различных изоформ CASC8. (а) Схема экзонной организации транскриптов CASC8. Штриховкой обозначены экзоны (или их части), аннотированные в базах данных, сплошным цветом – экзоны, наличие которых подтверждено экспериментально [10]. Пунктирными линиями указаны участки, комплементарные праймерам ПЦР для амплификации каждой из изоформ. (б) Уровни экспрессии транскриптов CASC8 (*i1*, *i2*, *i3*) в различных клеточных линиях рака поджелудочной железы по сравнению с контрольными клетками.

рах PDAC и сравнительный анализ уровней их экспрессии.

В качестве объектов исследования были выбраны четыре линии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы: MIA PaCa-2, PANC-1, AsPC-1 и Sarpan-2, отличающиеся по скорости пролиферации и/или степени дифференцировки [11]. Для контроля также использовали клетки PC-3 (аденокарцинома предстательной железы), VA-13 (фибробласты легкого) и HEK293 (фетальные клетки почки). Измерение количества РНК проводили с помощью ОТ-ПЦР, для нормировки использовали U6 мяРНК. Пары праймеров для ПЦР подбирали таким образом, чтобы они были комплементарны разным экзонам CASC8, а в

случае *i2* и *i3* – местам соединения экзонов (рис. 2а), т.е. амплифицировали каждую изоформу отдельно.

Все три контрольные линии PC-3, VA-13 и HEK293, а также Sarpan-2 (наименее агрессивная линия PDAC) демонстрировали крайне низкие уровни экспрессии транскрипта *i1* CASC8 – едва ли выше уровня детекции ОТ-ПЦР. Чуть более явная экспрессия была детектирована в случае AsPC-1, тогда как для MIA PaCa-2 количество *i1* было в ~20 раз выше. Кроме того, в данных клетках был также зафиксирован экстремально высокий уровень экспрессии *i2*, хотя по распределению транскриптов в других проанализированных клеточных линиях *i2* является минорной изофор-

мой. Напротив, изоформа *i3*, судя по всему, является преобладающей для клеток PDAC, и ее максимальная экспрессия была также зафиксирована для клеток MIA PaCa-2.

Исключением являются клетки PANC-1, для которых не удалось детектировать экспрессию ни одного из транскриптов CASC8. Таким образом, данная клеточная линия является своего рода природным нокдауном, что может быть использовано в последующих экспериментах. Напротив, клетки MIA PaCa-2 экспрессируют максимальное количество всех вариантов CASC8 РНК, включая условно минорный транскрипт *i2*. Мы полагаем, что данное отличие может быть обусловлено различной природой MIA PaCa-2 и PANC-1 [12]. Несмотря на то что обе клеточные линии происходят от агрессивных низкодифференцированных опухолей PDAC, они довольно сильно отличаются по морфологии, гетерогенности клеточной популяции и по экспрессии различных факторов. Основные споры вызывает эпителиально-мезенхимальный (EMT) статус данных линий. Хотя и MIA PaCa-2, и PANC-1 проявляют так называемый мезенхимальный фенотип, в большинстве научной литературы они считаются “квази-мезенхимальным” субтипом клеток PDAC [13]. При этом PANC-1 практически не экспрессирует E-кадгерин и обладает более явным метастатическим потенциалом [12]. Тем не менее в клеточных линиях AsPC-1 и Capan-2 преобладающей изоформой CASC8 также является *i3*, что свидетельствует об ограниченной применимости существующих литературных данных о функционировании CASC8 в PDAC [9], поскольку в этих исследованиях рассматривали только изоформу *i1*. Мы полагаем, что неверное аннотирование изоформ CASC8 также может являться причиной, по которой в некоторых научных исследованиях не удалось подтвердить факт активации этой днРНК в тканях поджелудочной железы пациентов с PDAC [14], поскольку при проведении ОТ-ПЦР использовали праймеры, комплементарные *i1*. Корректное аннотирование основного транскрипта CASC8 в последующих работах также является необходимым для оценки ее диагностического потенциала.

Таким образом, в ходе данного исследования мы впервые оценили экспрессию различных изоформ CASC8 в клетках протокового рака поджелудочной железы и выявили наиболее представленный транскрипт. Было обнаружено, что максимальная экспрессия всех изоформ CASC8 наблюдается в клеточной линии MIA PaCa-2, в то время как в клетках PANC-1 данная днРНК вовсе не экспрессируется. Данное отличие позволяет использовать PANC-1 как контрольную линию в экспериментах *in vitro*, а также как удобный модельный объект для суперэкспрессии CASC8. Отметим, что ген CASC8 расположен в локусе

8q24.21, кодирующем целый ряд важных про-опухолевых днРНК (PCAT1, PVT1, CCAT1, CCAT2, CCBC26 и др.) и микроРНК (miR-1204, miR-3686, miR-5194 и др.), находящихся в непосредственной близости от онкогена *Myc* и в том числе влияющих на его экспрессию [15]. Установление функциональной роли CASC8 (и ее отдельных транскриптов) может привести существенный вклад в понимание механизмов регуляции данного локуса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-74-00141.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawla P., Sunkara T., Gaduputi V. // World J Oncol. 2019. V. 10. P. 10–27.
2. Tsen A., Barbara M., Rosenkranz L. // Pancreatology. 2018. V. 18. P. 862–867.
3. Bolha L., Ravnik-Glavač M., Glavač D. // Dis Markers. 2017. V. 2017. P. 7243968.
4. Mortoglou M., Tabin Z.K., Arisan E.D., et al. // Transl. Oncol. 2021. V. 14. P. 101090.
5. Ghafouri-Fard S., Fathi M., Zhai T., et al. // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 1665.
6. Cui Z., Gao M., Yin Z., et al. // Cancer Manag Res. 2018. V. 10. P. 3141–3148.
7. Yang B., Gu B., Zhang J., et al. // Cancer Manag Res. 2020. V. 12. P. 13461–13467.
8. Jiang X., Guan J., Xu Y., et al. // J Cancer. 2021. V. 12. P. 387–396.
9. Zhu W., Gao W., Deng Y., et al. // Onco Targets Ther. 2020. V. 13. P. 12083–12096.
10. Kim T., Cui R., Jeon Y.J., et al. // Proc Natl Acad Sci USA. 2014. V. 111. P. 4173–4178.
11. Deer E.L., González-Hernández J., Coursen J.D., et al. // Pancreas. 2010. V. 39. P. 425–435.
12. Gradiz R., Silva H., Carvalho L., et al. // Sci Rep. 2016. V. 6. P. 21648.
13. Collisson E.A., Sadanandam A., Olson P., et al. // Nat Med. 2011. V. 17. P. 500–503.
14. Wang Y., Yang Y., Wang Y., et al. // Front Cell Dev Biol. 2020. V. 8. P. 392.
15. Wilson C., Kanhere A. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 1094.

EXPRESSION OF CASC8 RNA IN HUMAN PANCREATIC CANCER CELL LINES

**O. Y. Burenina^{a,#}, N. L. Lazarevich^{b,c}, I. F. Kustova^b, T. S. Zatsepin^d,
M. P. Rubtsova^d, Academician of the RAS O. A. Dontsova^{a,d}**

^a Center for Molecular and Cellular Biology, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Carcinogenesis, FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

^c Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^d Chemistry Department and Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

#e-mail: alunit@inbox.ru

A lot of long non-coding RNAs (lncRNAs) are expressed in human cells in a number of transcripts having different lengths and composition of exons. In case of cancer-associated lncRNAs, an actual task is to determine their specific isoforms, since each transcript can perform its own function in carcinogenesis and might have a unique expression profile in various types of tumors. For the first time, we analyzed the expression of CASC8 lncRNA in human pancreatic duct adenocarcinoma cell lines and found an abundant isoform, previously considered as minor in this type of cancer. We also revealed an extremely high expression levels of all CASC8 transcripts in MIA PaCa-2 cells and *vice versa* the lack of this lncRNA in PANC-1, that allows to use them as convenient models for further *in vitro* studies.

Keywords: long noncoding RNAs, CASC8, pancreatic cancer

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *HMA2* В ЛИСТЯХ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОПТИМАЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ЦИНКА В КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЕ И ЕГО ДЕФИЦИТЕ

© 2022 г. Н. М. Казнина^{1,*}, член-корреспондент НАН Беларуси Н. И. Дубовец², Н. С. Репкина¹, Ю. В. Батова¹, А. А. Игнатенко¹, О. А. Орловская¹, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов¹

Поступило 22.03.2022 г.

После доработки 09.04.2022 г.

Принято к публикации 11.04.2022 г.

У двух интрогрессивных линий мягкой пшеницы (15-7-1 и 15-7-2), различающихся аллельным статусом гена *Gpc-B1*, изучена экспрессия гена транспортного белка *HMA2* в флаговых листьях в условиях оптимального содержания цинка в корнеобитаемой среде (2 мкМ) и при его дефиците (0 мкМ). Впервые показано, что растения с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* (линия 15-7-1) характеризуются более высоким уровнем транскриптов гена *TaHMA2*, чем растения с нефункциональным его аллелем (линия 15-7-2), причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде. Важно, что высокая транскрипционная активность гена *TaHMA2* не отразилась на росте побегов, но соответствовала более высокому содержанию цинка в надземных органах растений. Высказано предположение, что белок NAC, кодируемый геном *Gpc-B1*, может участвовать в регуляции уровня экспрессии гена *TaHMA2*.

Ключевые слова: *TaHMA2*, дефицит цинка, рост, интрогрессивные линии пшеницы

DOI: 10.31857/S2686738922040072

Цинк является одним из наиболее важных микроэлементов, необходимых для нормальной жизнедеятельности человека. Во многом это связано с его ролью как структурного компонента или активатора более 300 ферментов, участвующих в обмене белков, углеводов и нуклеиновых кислот [1]. Кроме того, цинк является структурным элементом транскрипционных факторов с доменом “цинковые пальцы” (zinc finger), которые играют ключевую роль в регуляции экспрессии целого ряда генов. Поэтому дефицит цинка отрицательно сказывается на состоянии здоровья населения во многих регионах планеты, вызывая целый ряд заболеваний [2].

Как известно, в организм человека цинк поступает в основном с растительной пищей, поэтому наиболее эффективным и экономически оправданным подходом к решению проблемы де-

фицита этого микроэлемента считается повышение его содержания в зерне основных сельскохозяйственных культур за счет улучшения их генетических качеств, т.е. биофортификации [3, 4]. В настоящее время с использованием метода отдаленной гибридизации получены сорта (линии) мягкой пшеницы с улучшенными качествами зерна в отношении содержания в нем микроэлементов. Это стало возможным благодаря введению в различные сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) функциональных аллелей гена *Gpc-B1* (grain protein concentration) из *T. dicoccoides* [5]. Установлено, что этот ген кодирует белок NAC, принадлежащий к одному из специфичных для растений семейств NAC-факторов транскрипции, который регулирует процесс старения листьев и участвует в ремобилизации азота и ряда микроэлементов, включая цинк, из листьев в колос [6, 7]. Обнаружено, что растения с функциональным аллелем данного гена имеют более высокое содержание цинка в зерне, чем растения, у которых аллель этого гена нефункционален. Но чем обусловлены эти различия, пока не ясно. Поэтому в последнее время повышенное внимание уделяется изучению у злаков молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих поступление цинка в растение и его дальний транспорт в надземные органы, в том числе в семена.

¹ Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

*e-mail: kaznina@krc.karelia.ru

На сегодняшний день известно, что в гомеостазе цинка (поддержании необходимого его количества) участвует более 1800 генов, среди которых наибольшее количество — это гены белков-переносчиков [8]. Среди них наиболее изученными являются белки из семейства ZIP (*zinc-iron-regulated transporter*). Например, показано, что при дефиците цинка заметно возрастает экспрессия генов белка ZIP1 в побегах пшеницы [9], белков ZIP 3/7/8/10/13 в корнях и побегах ячменя [10], ZIP5 и ZIP8 — в побегах кукурузы [11], что приводит к активизации поглощения этого микроэлемента корнями и увеличению его содержания как в подземных, так и в надземных органах.

Об участии других белков транспортеров в адаптации растений к дефициту цинка данных относительно немного. Вместе с тем известно, что в гомеостазе двухвалентных металлов важную роль играют белки, участвующие в дальнем транспорте ионов и осуществляющие их перенос через плазмалемму клеток в проводящие сосуды. К ним, в частности, относятся белки HMA2 (*heavy metal ATPase2*), относящиеся к P_{1В}-типу АТФаз и осуществляющих загрузку ионов металлов, включая цинк, в ксилему и флоэму [12]. Участие HMA2-генов в гомеостазе цинка у злаков показано в целом ряде исследований [12, 13]. При этом обнаружено, что увеличение активности HMA2 транспортеров в условиях дефицита цинка может способствовать повышению его содержания в надземных органах и зерне.

Ранее нами было показано, что интрогрессивные линии мягкой пшеницы (*T. aestivum* сорт Фестивальная), созданные с участием *T. dicoccoides*, различаются аллельным статусом гена *Gpc-B1* и, как следствие, содержанием цинка в зерне [14]. В частности, у растений линии 15-7-1, содержащей функциональный аллель этого гена, содержание цинка оказалось почти в 2 раза выше, чем у растений линии 15-7-2 с его нефункциональным аллелем, причем не только в оптимальных условиях минерального питания, но и при дефиците этого микроэлемента в субстрате. Различаются ли растения этих линий по активности транспортных белков, не известно, хотя в литературе имеются данные, свидетельствующие об участии NAC-белков в регуляции активности ряда белков транспортеров [15, 16].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение уровня экспрессии гена *TaHMA2* в листьях растений пшеницы с разным функциональным статусом гена *Gpc-B1*, выращиваемых при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците.

В данном исследовании впервые установлено, что растения с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* характеризуются более высоким уровнем транскриптов гена *TaHMA2*, чем растения с его

нефункциональным аллелем, причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде. И это коррелировалось с более высоким содержанием цинка в надземных органах растений.

Растения пшеницы выращивали в условиях вегетационного опыта в песчаном субстрате в сосудах (объемом 6 л). Плотность посева — 12 растений на сосуд. Полив растений контрольного варианта осуществляли питательным раствором Хогланда-Арнона, в котором содержалось 2 мкМ цинка в виде его сернокислой соли (Zn оптимум). В опытных вариантах соль цинка в питательный раствор не вносили (Zn дефицит). Как показал химический анализ, содержание цинка в нем было менее 0.5 мкМ. В фазу созревания семян у растений измеряли высоту и сухую биомассу побега. В флаговых листьях измеряли содержание транскриптов гена *TaHMA2*. Помимо этого в побегах определяли содержание цинка.

Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед/мл) (“Синтол”, Россия). кДНК синтезировали, используя наборы для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами (“Евроген”). Количество и качество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpecPlus (“Bio-Rad”). Амплификацию образцов проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Bio-Rad”), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (“Евроген”). В качестве референсного гена использовали actin. Для проведения ПЦР использовали праймеры компании “Евроген”: Actin — номер в базе данных NCBI AG579382 (f — 5'-ggtcgtgaccttactgatgc-3', rev — 5'-caatagaggaaactgctctttgc-3'), *TaHMA2* — номер в базе данных NCBI GF489141 (f — 5'-gttcacgtctctctctctcac, rev — 5'-atcttcacatcctggtagc-3'). Протокол ПЦР: 5 мин при 95°C, далее 45 циклов 15 с при 95°C, 30 с при 56°C. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Накопление транскриптов генов вычисляли по $\Delta\Delta C_t$ [17]. В качестве контрольного образца использовали кДНК растений *T. aestivum* с. Фестивальная. Содержание цинка измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-7000 (Shimadzu, Япония). В каждом варианте опыта измерения проводились на 3–10 растениях (биологическая повторность) в зависимости от показателя, аналитическая повторность была 2–4-кратной. Статистическую значимость различий между средними оценивали на основании t-критерия Стьюдента. В статье обсуждаются только величины, статистически значимые при $p < 0.05$.

Проведенные исследования показали, что в оптимальных условиях минерального питания содержание транскриптов гена *TaHMA2* во флаговых листьях растений линии 15-7-1, имеющих функциональный аллель гена *Gpc-B1*, было более, чем в 7 раз выше, чем у растений линии 15-7-2, содержащих нефункциональный аллель этого гена. При недостатке цинка в корнеобитаемой среде оно возрастало у растений обеих линий, причем у линии 15-7-2 даже в большей степени, но тем не менее оставалось при этом гораздо ниже (почти в 5 раз), чем у линии 15-7-1 (рис. 1).

Имеющиеся в литературе сведения о зависимости между уровнем экспрессии гена *HMA2* и ростом растений носят противоречивый характер. Так, *hma2*-мутантные растения риса [13] и арабидопсиса [12] с нарушенной экспрессией гена *HMA2* заметно отставали в росте от дикого типа, при этом и содержание цинка в надземных органах у них было более низким. В то же время растения табака и пшеницы со сверхэкспрессией гена *HMA2* не отличались от дикого типа по росту вегетативных и генеративных органов, но содержали больше цинка в корнях и побегах [18].

В наших опытах, несмотря на значительные различия в экспрессии гена *TaHMA2* между растениями изученных линий, различия в изученных показателях роста побега у них не наблюдалось, причем независимо от содержания цинка в корнеобитаемой среде (табл. 1). Однако при этом содержание металла в побегах у растений изученных линий заметно различалось и было выше у растений линии 15-7-1 по сравнению с линией 15-7-2 как в условиях оптимального содержания цинка в субстрате, так и при его дефиците (табл. 2).

Поиск возможных путей биофортификации зерна пшеницы цинком является одной из важнейших селекционно-генетических задач, направленных на устранение дефицита этого микроэлемента в организме человека. Перспективным путем ее решения является создание с использованием метода отдаленной гибридизации сортов (линий) пшеницы, имеющих в геноме функциональный аллель гена *Gpc-B1* (от *T. dicoccoides*). В целом ряде исследований показано, что растения с функциональным аллелем этого гена отличаются более высоким содержанием цинка в зерне по сравнению с растениями, у которых аллель этого гена не функционален, что связано с лучшей ремобилизацией цинка из листьев в зер-

Содержание транскриптов гена *TaHMA2*, усл. ед.

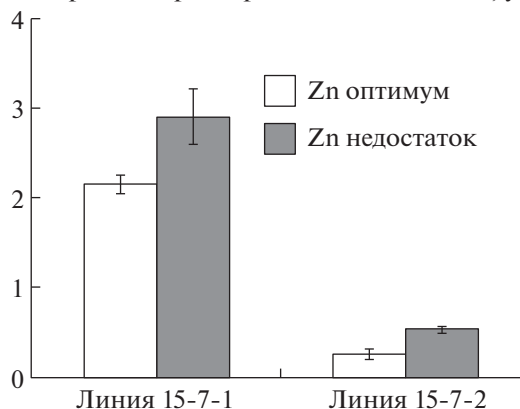


Рис. 1. Содержание транскриптов гена *TaHMA2* в листьях пшеницы при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците. За единицу принято содержание транскриптов гена в листьях *T. aestivum* с. Фестивальная.

но. Поскольку дальний транспорт цинка по растению осуществляется с помощью транспортных белков, крайне важным является изучение роли этих белков и кодирующих их генов в обеспечении зерна данным микроэлементом [19]. В литературе есть сведения, указывающие на участие гена *HMA2* в обеспечении растений цинком. Например, выявлено, что у растений риса со сверхэкспрессией гена *HMA2* возрастало по сравнению с диким типом содержание микроэлемента в надземных органах, что положительно сказывалось на скорости формирования семян [18]. В наших опытах более высокий уровень экспрессии гена *TaHMA2* в листьях пшеницы линии 15-7-1 также соответствовал более высокому содержанию цинка в побегах растений, что особенно отчетливо проявилось в условиях его дефицита в корнеобитаемой среде. При этом торможение роста побегов не наблюдалось.

В литературе имеются также сведения о том, что у *T. aestivum* белок GPC1 связан с изменениями уровней экспрессии нескольких транспортеров цинка, включая *ZIP* и *YSL* [15]. Помимо этого обнаружено, что у растений *T. durum* сорта US1114, имеющих в своем геноме ген *Gpc-B1*, при обработке флаговых листьев сульфатом цинка возрастал уровень экспрессии гена *HMA*, регулирующего экспорт цинка из хлоропластов в цито-

Таблица 1. Рост побегов пшеницы при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците

Показатель	Высота побега, см		Сухая биомасса побега, г	
	Zn оптимум (контроль)	Zn дефицит (опыт)	Zn оптимум (контроль)	Zn дефицит (опыт)
Линия 15-7-1	99.85 ± 3.78	94.05 ± 3.58	0.047 ± 0.005	0.040 ± 0.003
Линия 15-7-2	104.26 ± 3.33	104.45 ± 2.54	0.043 ± 0.003	0.045 ± 0.004

Таблица 2. Содержание цинка (мг/кг сухой массы) в побегах пшеницы при его оптимальном содержании в корнеобитаемой среде и дефиците

Линия	Zn оптимум (контроль)	Zn дефицит (опыт)
15-7-1	24.51 ± 0.54	22.23 ± 0.62
15-7-2	20.50 ± 0.40*	14.02 ± 0.51*

* – различия между линиями достоверны при $p < 0.05$.

плазму, а также генов транспортных белков ZIP1/15. При этом у растений сорта MACS3125, не имеющих гена *Gpc-B1*, подобный эффект отсутствовал [20]. Наши результаты показали, что содержание транскриптов гена *HMA2* у растений с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* значительно выше, чем у растений с его нефункциональным аллелем. Анализ литературы и полученных нами данных позволяет высказать предположение, что ген *Gpc-B1*, кодирующий NAC фактор транскрипции, участвует в регуляции экспрессии гена *HMA2*.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами впервые установлены различия в экспрессии гена транспортного белка *HMA2* в листьях растений пшеницы, различающихся аллельным статусом гена *Gpc-B1*. У растений с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* содержание транскриптов гена *TaHMA2* оказалось значительно выше, чем у растений с его нефункциональным аллелем, причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка. Это соответствовало более высокому содержанию цинка в побегах, но не отражалось на росте побега. Предполагается, что белок NAC, кодируемый геном *Gpc-B1*, может участвовать в регуляции уровня экспрессии гена *TaHMA2*.

Следует также еще раз отметить, что эффекты, связанные с наличием у растений функционального аллеля гена *Gpc-B1*, изучены пока крайне слабо. Однако поскольку такие растения являются перспективными с точки зрения биофортификации зерна пшеницы цинком и могут рассматриваться в качестве потенциального источника для улучшения качественных показателей зерна, то изучение этих эффектов, как в плане феноменологии, так и механизмов, лежащих в их основе, требуют проведения дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БелРФФИ № 20-516-00016, БРФФИ (грант № Б20Р-240) и государственного задания FMEN-2022-0004 на научном оборудовании центра коллективного пользования КарНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hänsch R., Mendel R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl) // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. V. 12. P. 259–266.
2. Hotz C., Brown K.H. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control // *Food Nutr. Bul.* 2004. V. 25. P. 94–204.
3. Mayer J.E., Pfeiffer W.H., Beyer P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. P. 166–170.
4. Velu G., Ortiz-Monasterio I., Cakmak I., et al. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat // *J. Cereals.* 2014. V. 59. № 3. P. 365–372.
5. Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2016. Т. 20. № 4. С. 545–554.
6. Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., et al. A NAC gene 15 regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science.* 2006. № 314. P. 1298–1301.
7. Avni R., Zhao R., Pearce S., et al. Functional characterization of *GPC-B1* genes in hexaploid wheat. *Planta.* 2014. V. 239. P. 313–324.
8. Walter S., Kahla A., Arunachalam C., Perochon A., et al. A wheat ABC transporter contributes to both grain formation and mycotoxin tolerance // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. № 9. P. 2583–2593.
9. Durmaz E., Coruh C., Dinler G., et al. Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under zinc deficiency in wild emmer wheat // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2011. V. 29. P. 582–596.
10. Tiong J., McDonald G., Genc Y., et al. Increased expression of six ZIP family genes by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced uptake and root-to-shoot translocation of Zn in barley (*Hordeum vulgare*). // *New Phytol.* 2015. № 207. P. 1097–1109.
11. Li Y., Zhang Y., Shi D., et al. Spatial-temporal analysis of zinc homeostasis reveals the response mechanisms to acute zinc deficiency in *Sorghum bicolor* // *New Phytol.* 2013. V. 200. P. 1102–1115.
12. Hussain D., Haydon M.J., Wang Y., et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 1327–1339.
13. Satoh-Nagasawa N., Mori M., Nakazawa N., et al. Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of zinc and cadmium // *Plant Cell Physiol.* 2012. V. 53. P. 213–224.
14. Kaznina N., Dubovets N., Batova Y., et al. The Response of wheat with different allele statuses of the *Gpc-B1* gene under zinc deficiency // *Agronomy.* 2021. V. 11. P. 1057.

15. Pearce S., Tabbita F., Cantu D., et al. Regulation of Zn and Fe transporters by the *GPC1* gene during early wheat monocarpic senescence // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. P. 368.
16. Gupta O.P., Pandey V., Saini R. et al. Comparative physiological, biochemical and transcriptomic analysis of hexaploid wheat (*T. aestivum* L.) roots and shoots identifies potential pathways and their molecular regulatory network during Fe and Zn starvation // Genomics. 2021. V. 113. P. 3357–3372.
17. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
18. Tan J., Wang J., Chai T., et al. Functional analyses of TaHMA2, a P₁B-type ATPase in wheat // Plant Biotech. J. 2013. V. 11. P. 420–431.
19. Krishna A.T.P., Maharajan T., Victor R.G., et al. Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 662.
20. Deshpande P., Dapkekar A., Oak M., et al. Nanocarrier-mediated foliar zinc fertilization influences expression of metal homeostasis related genes in flag leaves and enhances gluten content in durum wheat // PLoS One. 2018. V. 13. e0191035.

THE *HMA2* GENE EXPRESSION IN LEAVES OF INTROGRESSIVE WHEAT LINES UNDER ZN OPTIMUM AND DEFICIENCY CONTENT IN ROOT ENVIRONMENT

N. M. Kaznina^{a, #}, Corresponding Member of the NANB N. I. Dubovets^b, N. S. Repkina^a, Yu. V. Batova^a,
A. A. Ignatenko^a, O. A. Orlovskaya^a, and Corresponding Member of the RAS A. F. Titov^a

^a Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petрозаводск, Russian Federation

^b Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

[#]e-mail: kaznina@krc.karelia.ru

In two introgressive lines of bread wheat (15-7-1 и 15-7-2), which differ in the allelic status of the *Gpc-B1* gene, the expression of gene, encoding HMA2 transport protein in flag leaves under optimum Zn content in substrate (2 мкМ) and its deficiency (0 мкМ), were investigated. In present research we introduced a novel data about higher gene expression of *TaHMA2* in plants with functional allele *Gpc-B1* gene (line 15-7-1) compare to plants with non-functional allele *Gpc-B1* gene (line 15-7-2) under optimum Zn amount in substrate as well as under its deficiency. It is important to note, that high HMA2 gene expression did not affected the wheat growth but correlated to high Zn concentration in aboveground part of plants. Suposed, that NAC transcription factor encoded by *Gpc-B1* gene, can be involved in regulation of *TaHMA2* gene.

Keywords: *TaHMA2*, zinc deficiency, growth, introgressive wheat lines

УДК 577.1+577.2+577.3

АНКСИОЛИТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ МОРСКОЙ АНЕМОНЫ *HETERACTIS CRISPA*, МОДУЛЯТОРОВ TRPV1 И ASIC КАНАЛОВ

© 2022 г. О. В. Синцова¹, Р. С. Калина¹, И. Н. Гладких¹, Ю. А. Паликова², В. А. Паликов², Н. А. Бороздина², А. А. Климович¹, А. С. Меньшов¹, И. А. Дьяченко², Е. В. Лейченко^{1,*}

Представлено академиком РАН В.А. Стонином

Поступило 15.03.2022 г.

После доработки 02.04.2022 г.

Принято к публикации 04.04.2022 г.

Ранее сообщалось о вовлеченности ваниллоидных (TRPV) и кислоточувствительных (ASIC) ионных каналов в физиологические процессы, связанные с развитием тревожных расстройств. Это делает их лиганды новыми потенциальными анксиолитическими средствами. Нами была изучена эффективность двух пептидов морской анемоны *Heteractis crispa*, Hcr 1b-2 и HCRG21, модуляторов ASIC1a и TRPV1 каналов, соответственно, в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт. Согласно полученным данным, HCRG21 вызывает достоверное снижение уровня тревожности и стимулирует активность животных в исследуемых дозах 0.01–1 мг/кг, в то время как Hcr 1b-2 оказывает слабо выраженное анксиолитическое действие только в дозе 0.1 мг/кг. Изучение фармакодинамики HCRG21 показало, что пептид оказывает анксиолитическое действие в течение 2 ч, при этом эффективность исследуемого пептида выше эффективности препарата сравнения.

Ключевые слова: ионный канал TRPV1, кислоточувствительные ионные каналы, анальгетические пептиды, антидепрессанты, анксиолитический эффект, тревожные расстройства, ЦНС

DOI: 10.31857/S268673892204014X

Тревожные расстройства (генерализованное тревожное расстройство, паническое расстройство, социальное тревожное расстройство и др.) являются распространенными психическими расстройствами [1]. Диагностика тревожных расстройств часто затруднена (особенно при обращении пациентов к специалистам общего профиля), что связано с большим разнообразием клинических проявлений [2].

Препараты первого выбора для лечения таких расстройств – это селективные ингибиторы обратного захвата серотонина и ингибиторы обратного захвата серотонина-норадреналина. Другие варианты лечения включают прегабалин, трициклические антидепрессанты, буспирон, моклобемид и другие, которые, к сожалению, также не лишены побочных эффектов [1]. В то же время поиск и изучение новых лидерных соеди-

нений для их лечения представляются актуальным.

Установлено, что в физиологических процессах, связанных с тревожным поведением, важную роль играют ваниллоидные (TRPV) и кислоточувствительные (ASIC) ионные каналы [3–5]. В этом контексте каналы TRPV1 кажутся многообещающей терапевтической мишенью [6]. Синаптическая коммуникация и процессы долговременной депрессии также связаны с активностью TRPV1 [7]. Кроме того, TRPV1 каналы способны влиять на эндованиллоидную и опиоидную системы, участвующие в патофизиологии таких расстройств, как зависимость и тревожность [8]. Наконец, показано, что TRPV1 косвенно вовлечен в модуляцию активности μ -опиоидных рецепторов (MOR) и рецепторов каннабиноидного типа 1 (CB1) [8]. Некоторые доклинические данные позволяют предположить, что подтип TRPV1 является наиболее подходящей мишенью-кандидатом для разработки терапевтически полезных модуляторов для лечения депрессии, паники, беспокойства и аддиктивных расстройств [9, 10].

Еще одним из механизмов, лежащих в основе развития чувства страха и тревожных расстройств, является ASIC1a-опосредованный молекулярный механизм [11]. Помимо участия

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

² Филиал Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: leychenko@gmail.com

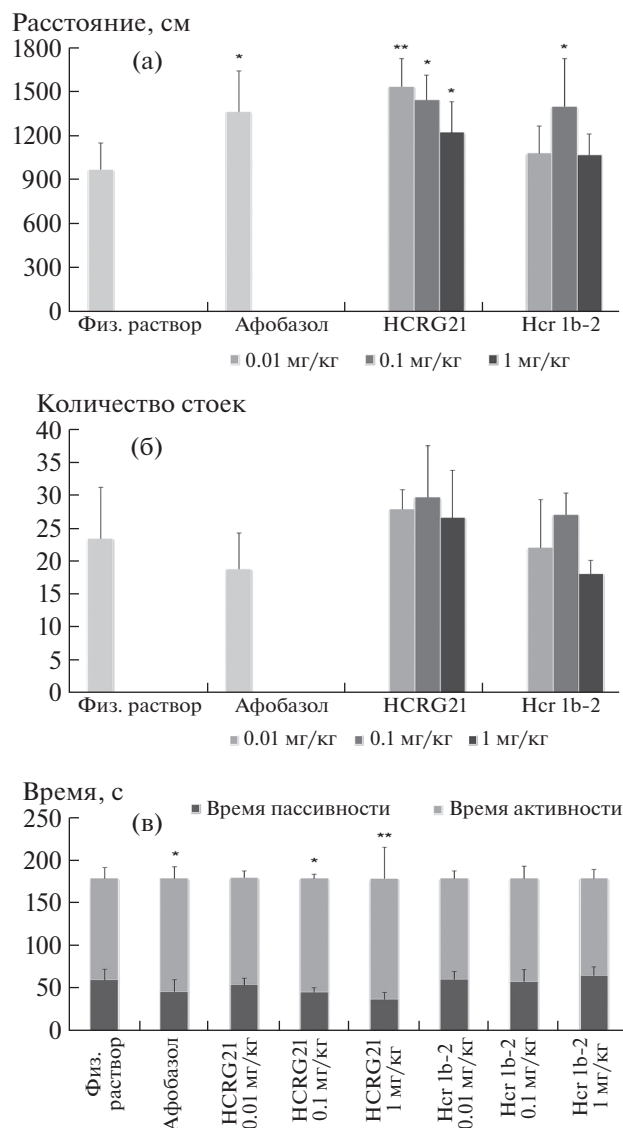


Рис. 1. Показатели локомоторной и ориентировочно-исследовательской активности животных в тесте “Открытое поле”: а – пройденное расстояние; б – вертикальная активность; в – время активности и время пассивности животных во время тестирования (3 мин). Результаты представлены как $MEAN \pm SD$, при $n = 7$. Достоверные отличия представлены относительно контрольной группы (Физ. раствор), * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, (t -тест).

ASIC1a в обучении, памяти и синаптической пластичности, эти каналы являются хеморецепторами ЦНС, реагирующими на снижение pH в головном мозге в результате вдыхания CO_2 . Это приводит к активации ASIC1a каналов в миндалевидном теле, ответственных за реализацию поведения, связанного со страхом, и провоцирует повышение тревожности [11]. Показано, что мыши, нокаутные по гену, кодирующему ASIC1a, значительно менее подвержены возникновению чувства тревоги в ответ на резкие шумы и запах хищника [12], тогда как повышенная экспрессия каналов в организме приводит к усилению этого чувства [13].

В настоящей работе анксиолитический эффект двух пептидных модуляторов ионных каналов, HCRG21 – блокатора TRPV1 (IC_{50} 6.9 мкМ) [14] и Hcr 1b-2 – ингибитора ASIC1a (IC_{50} 4.8 мкМ) [15], был изучен на мышах линии ICR в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт. В качестве препарата сравнения использовали афобазол – широко применяемое в клинической практике лекарственное средство с выраженным анксиолитическим эффектом.

Пептид Hcr 1b-2 (41 а.о., 4522 Да) был выделен из экстракта морской анемоны *Heteractis crispa*, как было описано ранее [15], тогда как пептид HCRG21 (56 а.о., 6228 Да), аминокислотная по-

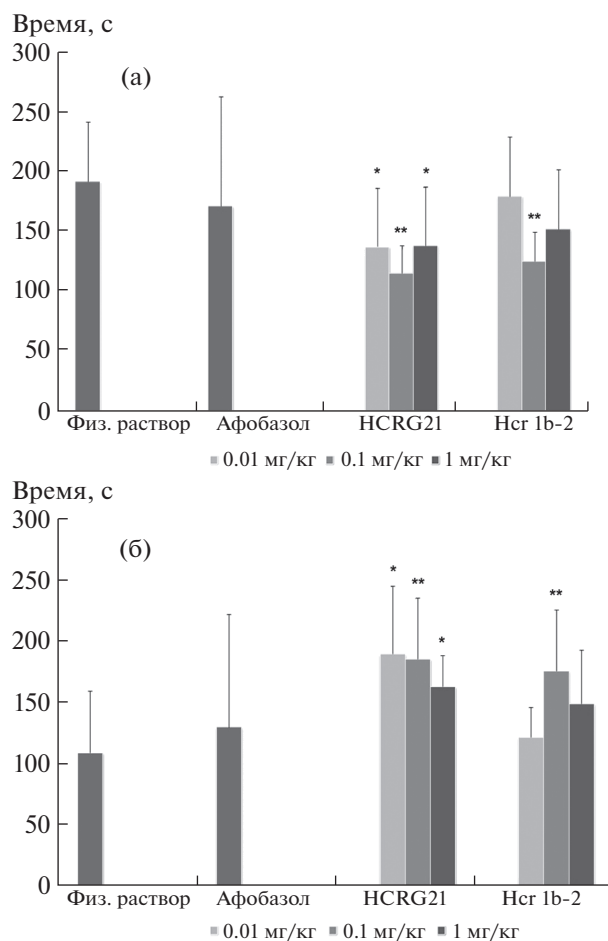


Рис. 2. Показатели эмоционально-двигательного поведения разных групп животных в тесте ПКЛ при внутримышечном введении пептидов. а – закрытые рукава, б – открытые зоны (открытые рукава, центральная площадка). Результаты представлены как MEAN \pm SD, при $n = 7$. Достоверные отличия представлены относительно контрольной группы (физ. раствор), * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$ (t -тест).

следовательность которого была установлена при анализе транскриптов, кодирующих пептиды Кунитц-типа той же морской анемоны, был получен с помощью гетерологической экспрессии в системе *Escherichia coli* [14].

Влияние пептидов на двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение животных было изучено с помощью стандартных установок “Открытое поле” (Optovarimex ATM3 auto system, Columbus, USA) и “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ) (Open Science, Россия). Анксиолитическая активность пептидов оценивалась по снижению уровня тревожности и страха, по увеличению уровня исследовательской мотивации, показателя принятия решения и общей двигательной активности, которая определялась по времени пребывания в открытых зонах и по латентному периоду ухода с центра площадки [16].

В экспериментах использовались самцы мышей линии ICR. Животные были получены из НПП ФИБХ РАН питомника лабораторных животных “Пушино” в возрасте 4 нед. Животные содержались в комнате содержания животных барьерной зоны 2 в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20–24°C, относительная влажность 30–70%, 12-часовой цикл освещения (08:00–20:00 – “день”, 20:00–08:00 – “ночь”) и, по крайней мере, 10-кратная смена объема воздуха комнаты в час). Все экспериментальные процедуры одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных “ФИБХ РАН”.

Пептиды в дозах 0.01–1 мг/кг в физиологическом растворе были введены внутримышечно за 1 ч до тестирования. В качестве препарата сравнения был использован доступный коммерческий анксиолитический препарат “Афобазол”, который вводился мышам контрольной группы перорально в дозе 5 мг/кг за 1 ч до тестирования. Анк-

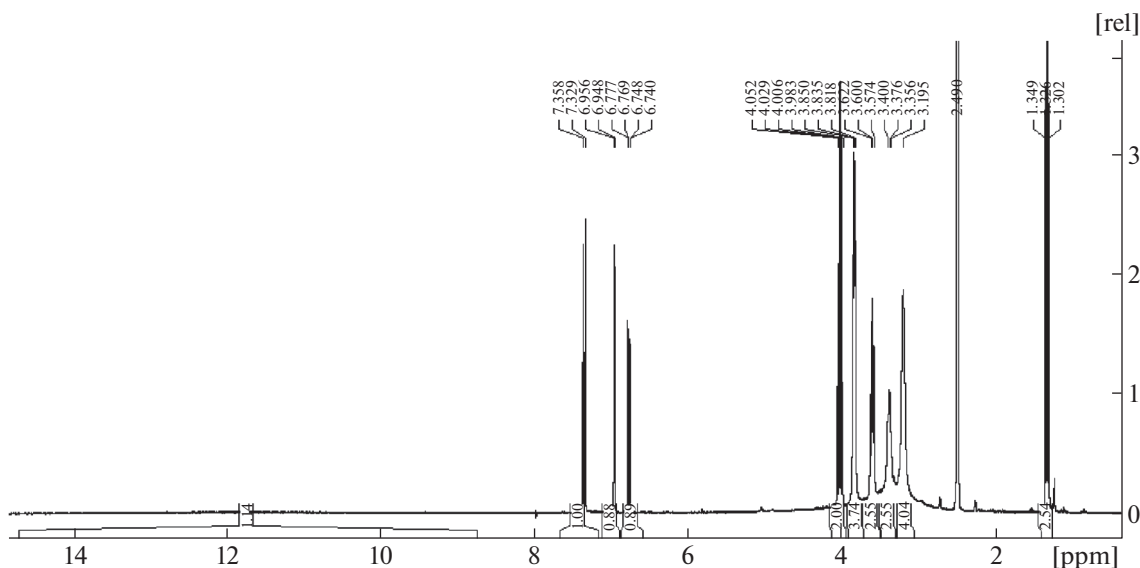


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР. Шкала химических сдвигов привязана к сигналу протонов диметилсульфида (2.49 м.д.).

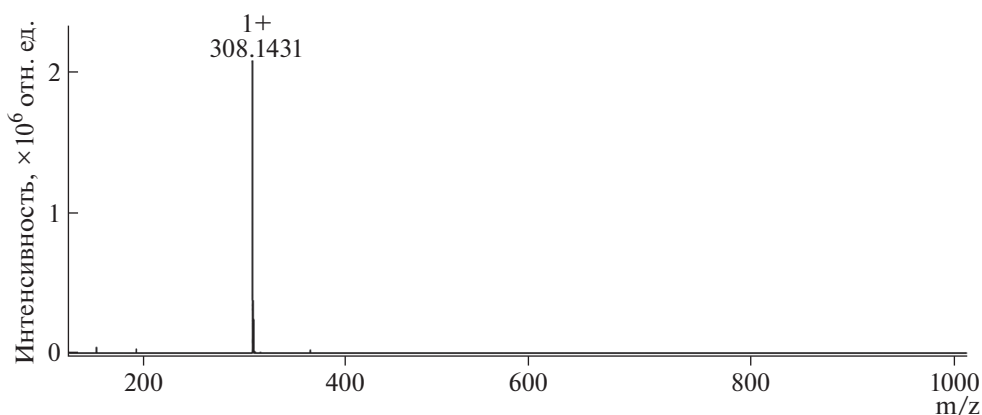


Рис. 4. ИЭР масс-спектр фабомотизола. Масс-спектр был получен на масс-спектрометре Agilent 6510 Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies, США), оборудованном источником ионизации электрораспылением Dual-Spray ESI, с помощью программ MassHunter Data Acquisition и MassHunter Qualitative Analysis (вер. 02.00, Agilent Technologies, США).

сиолитический эффект препарата “Афобазол” в условиях стресса проявляется в снижении внутреннего напряжения, беспокойства, тревоги, страха, улучшении адаптивных способностей и восстановлении когнитивных функций. При этом наблюдается “пассивный” тип эмоционально-стрессовой реакции у животных: снижение подвижности и исследовательской мотивации, которое проявляется в реакции замирания.

В результате оценочных тестов (продолжительность тестирования составляла 3 мин на установке “Открытое поле” и 5 мин на ПКЛ) было установлено, что оба пептида оказывают выраженное анксиолитическое действие и умеренный стимулирующий эффект на ЦНС.

Пептид HCRG21 стимулировал двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность животных при отсутствии выраженного возбуждающего действия на ЦНС. В группах животных, пролеченных HCRG21, наблюдалось умеренное увеличение как пройденного расстояния, так и времени активности, в том числе и вертикальной активности, по сравнению с контрольной группой (рис. 1). Достоверность статистических различий определяли с помощью параметрического t -критерия Стьюдента для независимых выборок. За достоверные принимали различия при $P \leq 0.05$. Статистическую и графическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2007. Нейростимулирующий

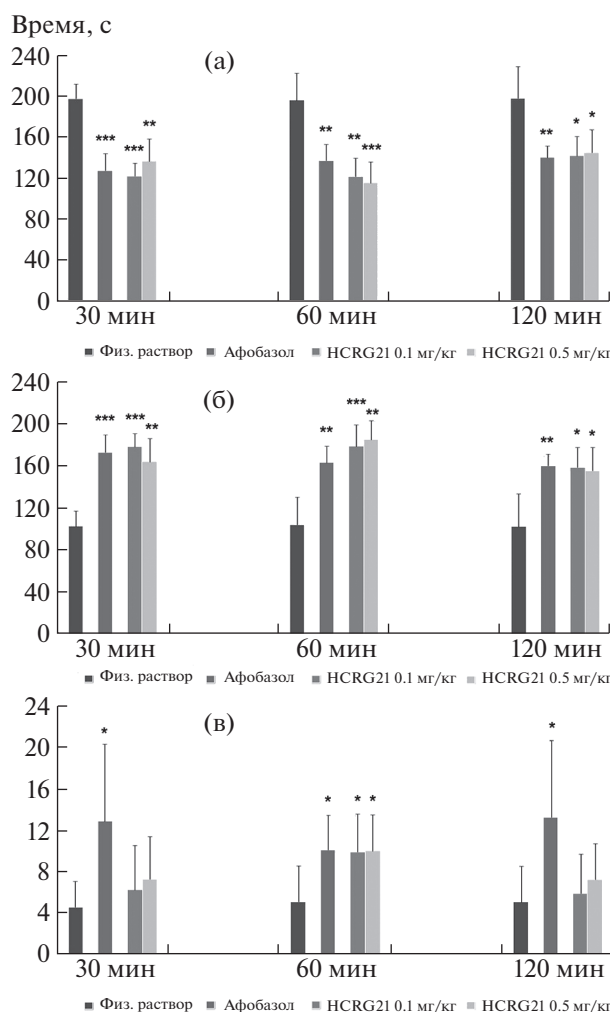


Рис. 5. Динамика анксиолитического действия пептида HCRG21 при внутримышечном введении в тесте ПКЛ. а – время пребывания в закрытых рукавах, б – время пребывания в открытых зонах (открытые рукава, центральная площадка), в – латентный период ухода с центральной площадки. Результаты представлены как MEAN ± SD, при $n = 7$. Достоверные отличия представлены относительно контрольной группы (физ. раствор), * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$ (t -тест).

эффект HCRG21 был дозозависимым (рис. 1а). Пептид Hcr 1b-2 не оказывал стимулирующее действие на ЦНС, хотя в дозе 0.1 мг/кг (рис. 1б) наблюдалось достоверное увеличение пройденного расстояния, при этом время активности было сравнимо с контрольной группой (рис. 1в).

Пептиды заметно снижали уровень тревожности и стимулировали исследовательскую мотивацию животных. В тесте ПКЛ было обнаружено достоверное увеличение времени, проводимого в открытых зонах лабиринта, при одновременном уменьшении времени пребывания в закрытых рукавах по сравнению с контрольной группой (рис. 2). Учитывая боязнь высоты и открытого освещенного пространства у грызунов, данные показатели можно рассматривать как проявление меньшей тревожности у мышей. Следует отметить, что

HCRG21 оказывал анксиолитическое действие во всех исследуемых дозах и превосходил по эффективности препарат сравнения “Афобазол”, тогда как достоверное анксиолитическое действие Hcr 1b-2 в тесте ПКЛ проявлялось только в дозе 0.1 мг/кг.

Примечательно, что блокатор TRPV1 канала, пептид HCRG21, обладал более выраженным анксиолитическим эффектом, чем пептид Hcr 1b-2, ингибитор канала ASIC1a, при относительно близких значениях IC_{50} данных пептидов по отношению к соответствующим каналам. Данный факт может косвенно указывать на большую вовлеченность TRPV1, нежели ASIC1a каналов, в процессы патогенеза тревожных расстройств, с одной стороны, но также быть результатом выра-

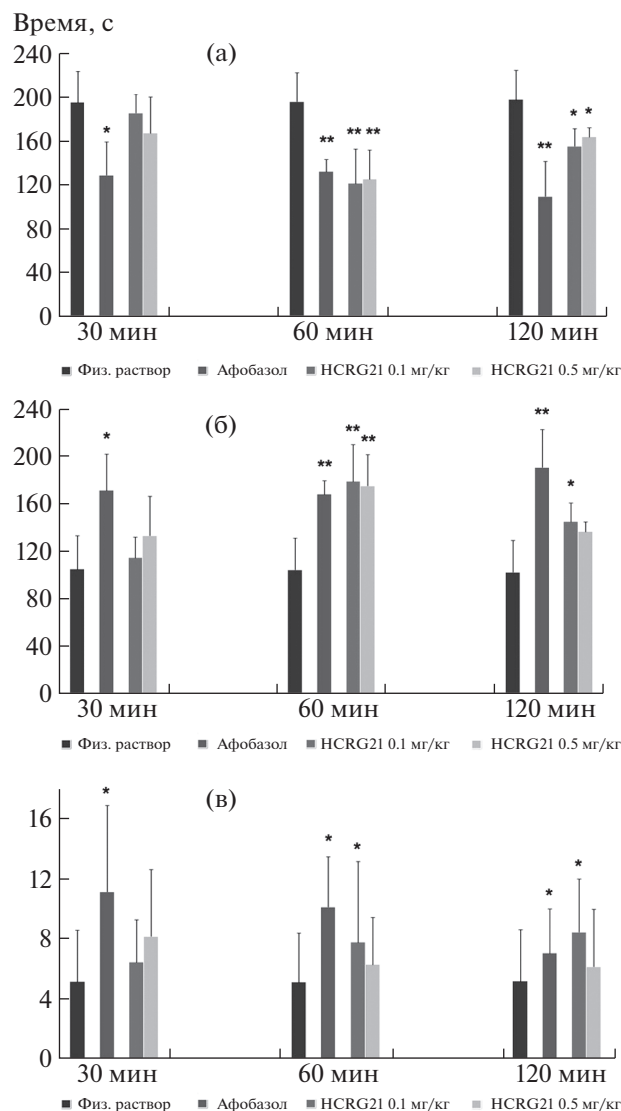


Рис. 6. Динамика анксиолитического действия пептида HCRG21 при пероральном введении в тесте ПКЛ. а – время пребывания в закрытых рукавах, б – время пребывания в открытых зонах (открытые рукава, центральная площадка), в – латентный период ухода с центральной площадки. Результаты представлены как MEAN \pm SD, при $n = 7$. Достоверные отличия представлены относительно контрольной группы (физ. раствор), * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$ (t -тест).

женного неспецифического действия пептида Hcr 1b-2 на ряд молекулярных мишеней [17].

Для HCRG21 была изучена фармакодинамика при внутримышечном и пероральном способах введения в дозах 0.1 и 0.5 мг/кг в тесте ПКЛ. Для перорального введения в качестве препарата сравнения был использован препарат “Афобазол” в дозе 5 мг/кг. Для внутримышечного введения в дозе 5 мг/кг использовали действующее вещество препарата “Афобазол” – фабототизол, который получали экстракцией таблеток массой 4.5 г (содержание действующего вещества 0.3 г) 0.05 М раствором гидрокарбоната натрия (температура 25°C, 1 ч), с последующим извлечением

его из солевого раствора этилацетатом (соотношение объемов фаз 1 : 1). Наличие фабототизола было подтверждено методом ^1H -ЯМР спектроскопии (300.13 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J, Гц): 7.34 (d, 8.7 Hz, 1H), 6.95 (d, 2.31 Hz, 1H), 6.76 (dd, $J = 8.70, 2.40$ Hz, 1H), 4.02 (q, $J = 6.96$ Hz, 2H), 3.83 (t, $J = 4.71$ Hz, 4H), 3.60 (t, $J = 7.17$ Hz, 2H), 3.38 (t, $J = 6.45$ Hz, 2H), 3.20 (br.s., 4H), 1.33 (t, $J = 6.84$ Hz, 3H) (рис. 3). Полученные значения химических сдвигов (δ) и констант спин-спиновой взаимодействия (J) соответствовали литературным данным [18]. Чистота фабототизола была подтверждена с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (рис. 4). Теоретическое и полученное

значения m/z для пика моноизотопного $[M + H]^+$ иона составили 308.1427 и 308.1431. Да соответственно.

Установлено, что при внутримышечном введении пептид в обеих дозах достоверно увеличивал время пребывания животных на открытых зонах ПКЛ, и латентный период ухода с центральной площадки и уменьшал время пребывания в закрытых рукавах. Анксиолитическое действие HCRG21 проявлялось уже спустя 30 мин и повышалось спустя 60 мин после введения, причем его эффект был сравним (через 30 мин) или превосходил (через 60 мин) эффект фабомотизола (рис. 5). Через 120 мин после введения было отмечено незначительное (примерно на 10%) снижение эффективности, как пептида в обеих дозах, так и фабомотизола.

При пероральном способе введения анксиолитическое действие HCRG21 было менее выраженным и пролонгированным, чем при внутримышечном. Через 60 мин после введения эффект пептида в обеих дозах был сопоставим с эффектом афобазола в дозе 5 мг/кг: наблюдались достоверное уменьшение времени пребывания в закрытых рукавах и повышение времени пребывания в открытых зонах. Через 120 мин эффект HCRG21 заметно снижался (рис. 6).

Представленные в работе результаты согласуются с данными, полученными для ряда других ингибиторов ASICs и TRPV1 в различных экспериментах, связанных с изучением анксиолитического и антидепрессивного действия [3, 4, 19–21]. Они не только подтверждают гипотезу об участии ионных каналов в генезе тревожных расстройств, но и создают предпосылки для разработки новых эффективных противотревожных препаратов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.х.н. Р.С. Попову за получение масс-спектра высокого разрешения. В работе использовалось оборудование Дальневосточного центра структурных молекулярных исследований (ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Получение, изучение анксиолитического эффекта и фармакодинамики пептида HCRG21 выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 19-74-20088, <https://rscf.ru/project/19-74-20088/>. Выделение пептида Hcr 1b-2 и исследование его влияния на уровень тревожности мышшей выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00912, <https://rscf.ru/project/22-24-00912/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bandelow B., Michaelis S., Wedekind D.* Treatment of anxiety disorders // *Dialogues Clin. Neurosci.* 2017. V. 19. № 2. P. 93–107.
2. *Wittchen H.-U.* Generalized anxiety disorder: prevalence, burden, and cost to society // *Depress. Anxiety.* 2002. V. 16. № 4. P. 162–171.
3. *Coryell M.W., Wunsch A.M., Haenfler J.M., et al.* Acid-Sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 17. P. 5381–5388.
4. *Sluka K.A., Winter O.C., Wemmie J.A.* Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2009. V. 12. № 5. P. 693–704.
5. *Aguilar D.C., Terzian A.L.B., Guimaraes F.S., et al.* Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats // *Psychopharmacology (Berl).* 2009. V. 205. № 2. P. 217–225.
6. *Escelsior A., Sterlini B., Murri M.B., et al.* Transient receptor potential vanilloid 1 antagonism in neuroinflammation, neuroprotection and epigenetic regulation: Potential therapeutic implications for severe psychiatric disorders treatment // *Psychiatr. Genet.* 2020. V. 30. № 2. P. 39–48.
7. *Grueter B.A., Brasnjo G., Malenka R.C.* Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 12. P. 1519–1526.
8. *Zador F., Wollemann M.* Receptome: Interactions between three pain-related receptors or the “triumvirate” of cannabinoid, opioid and TRPV1 receptors // *Pharmacol. Res.* 2015. V. 102. P. 254–263.
9. *Naziroglu M., Demirdas A.* Psychiatric disorders and TRP channels: Focus on psychotropic drugs // *Curr. Neuropharmacol.* 2015. V. 13. № 2. P. 248–257.
10. *Quagliato L.A., Nardi A.E.* The role of convergent ion channel pathways in microglial phenotypes: a systematic review of the implications for neurological and psychiatric disorders // *Transl. Psychiatry.* 2018. V. 8. P. 259.
11. *Ziemann A.E., Allen J.E., Dahdaleh N.S., et al.* The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior // *Cell.* 2009. V. 139. № 5. P. 1012–1021.
12. *Coryell M.W., Ziemann A.E., Westmoreland P.J., et al.* Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit // *Biol. Psychiatry.* 2007. V. 62. № 10. P. 1140–1148.
13. *Wemmie J.A., Coryell M.W., Askwith C.C., et al.* Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. V. 101. № 10. P. 3621–3626.
14. *Monastyrnaya M., Peigneur S., Zelepuga E., et al.* Kunitz-Type peptide HCRG21 from the sea anemone

- Heteractis crispa* is a full antagonist of the TRPV1 receptor // *Mar. Drugs*. 2016. V. 14. № 12. P. 229.
15. Kalina R., Gladkikh I., Dmitrenok P., Chernikov O., Koshchelev S., Kvetkina A., Kozlov S., Kozlovskaya E., Monastyrnaya M. New APETx-like peptides from sea anemone *Heteractis crispa* modulate ASIC1a channels. *Peptides* 2018. V. 104. P. 41–49.
 16. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2013.
 17. Pinheiro-Junior E.L., Kalina R., Gladkikh I., et al. A tale of toxin promiscuity: The versatile pharmacological effects of Hcr 1b-2 sea anemone peptide on voltage-gated ion channels // *Mar. Drugs*. 2022. V. 20. № 2. P. 147.
 18. Электронный источник: <https://www.tsbiochem.com/compound/Afobazole%20hydrochloride>. Ссылка активна на 5 марта 2022.
 19. Тишкина А.О., Мартыанова Е.К., Логашина Ю.А., и др. Эффекты интраназального введения пептидного антагониста ванилоидного рецептора типа I (TRPV1) на центральную нервную систему грызунов // Доклады биологических наук. 2016. Т. 470. № 1. С. 234–236.
 20. Kasckow J.W., Mulchahey J.J., Geraciotti T.D. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behavior // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 2004. V. 28. № 1. P. 291–295.
 21. Hayase T. Differential effects of TRPV1 receptor ligands against nicotine-induced depression-like behaviors // *BMC Pharmacol*. 2011. V. 11. № 1. P. 6.

ANXIOLYTIC EFFECT OF PEPTIDES FROM THE SEA ANEMONE *HETERACTIS CRISPA*, MODULATORS OF TRPV1 AND ASIC CHANNELS

O. V. Sintsova^a, R. S. Kalina^a, I. N. Gladkikh^a, Y. A. Palikova^b, V. A. Palikov^b, N. A. Borozdina^b,
A. A. Klimovich^a, A. S. Menshov^a, I. A. Dyachenko^b, and E. V. Leychenko^{a, #}

^a G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, RAS, Pushchino,
Moscow region, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS V.A. Stonik

A number of studies confirmed the involvement of transient receptor potential vanilloid (TRPV) and acid-sensing (ASIC) ion channels in the physiological processes associated with the anxiety disorders development. This makes their ligands new potential anxiolytic agents. We examined the efficacy of two peptides from the sea anemone *Heteractis crispa*, Hcr 1b-2 and HCRG21, affecting ASIC1a and TRPV1 channels, respectively, in the open field and elevated plus maze tests. According to the obtained data, HCRG21 significantly decrease both the level of anxiety and stimulated the activity of animals at doses 0.01–1 mg/kg, while Hcr 1b-2 has a weak anxiolytic effect only at a dose of 0.1 mg/kg. The pharmacodynamic study showed that the HCRG21 has an anxiolytic effect for 2 hours, and its effectiveness is higher than that of the reference drug.

Keywords: TRPV1 ion channel, acid-sensing ion channels, analgesic peptides, antidepressants, anxiolytic effect, anxiety disorders, CNS

УДК 615.012.6

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ МИЦЕЛИЯ *INONOTUS RHEADES* И ИХ ОЦЕНКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2022 г. Г. Б. Боровский¹, Т. Г. Горностай¹, М. С. Полякова¹,
Е. А. Лозовская^{2,*}, С. Б. Никифоров²

Представлено академиком РАН Б.А. Трофимовым

Поступило 18.03.2022 г.

После доработки 02.04.2022 г.

Принято к публикации 04.04.2022 г.

Оценивали противоопухолевые свойства водных экстрактов базидиального гриба *Inonotus rheades*, при культивировании на древесных дисках и древесной стружке (береза) при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте и при постоянном освещении синими светодиодами мощностью 12.8 Вт/м^2 . Выделяли и анализировали водную фракцию, содержащую водорастворимые полисахариды: ВР-5 – фракция, культивированная на древесных дисках при освещении синим светом; ВР-8, фракция, выращенная в аналогичных условиях на древесных стружках; ВР-6 – фракция, выращенная в темноте на древесных дисках; ВР-7 фракция, выращенная в аналогичных условиях на древесных стружках. Противоопухолевое действие экстрактов проводили на модели перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха на мышах. Выявлено, что экстракты, выделенные из базидиального гриба *Inonotus rheades* проявляют противоопухолевые свойства, при этом их накопление в процессе роста определяется различными условиями культивирования.

Ключевые слова: *Inonotus rheades*, водорастворимые полисахариды, противоопухолевая активность, культивирование, действие синего света

DOI: 10.31857/S2686738922040023

Известно, что свет является фактором, влияющим на рост и развитие грибов, имеющих хромофоры [1] и биологические механизмы восприятия УФ-излучения, синего, зеленого и красного света [2], что определило цель изучения влияния света на процесс роста грибов в биотехнологических целях с применением светодиодных ламп. Показано, что использование красного света усиливает рост и выход биомассы мицелия *Laetiporus sulphureus* [3], *Coprinus vaporaris* или *congregatus* и *Serpula lacrimans* [4]. Лазерное облучение с длиной волны 632.8 нм в непрерывном и импульсном режиме позволило повысить антимикробную активность мицелия и культуральной жидкости глубинной культуры *Pleurotus ostreatus* по отношению к *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus mycoides* на 10–20% [3].

Доказано влияние света на метаболизм и содержание метаболитов у грибов [5]. Культивирование гриба *Ganoderma lucidum* в условиях освещения синим светом способствовало накоплению полисахаридов на каждой стадии развития, чем при культивировании его в темноте [6]. Применение УФ-излучения повышало содержание полисахаридов в мицелии *Inonotus obliquus* до 2.4% [7]. Облучение синим и красным светом мицелия *G. lucidum* увеличивало накопление экзо- и эндополисахаридов [8]. Частичное подавление образования фелигридинов и даваллиялактонов отмечено для погруженной культуры *I. obliquus*, выращенной в синем и красном свете, в темноте содержание этих соединений было выше [9]. Для *I. rheades* в процессе роста была установлена зависимость химического состава мицелия от длины волны света [10]. Установлено повышение противовирусных свойств водных экстрактов из мицелия *I. rheades*, выращенного в условиях освещения синим светом на дисках березы [11].

Из грибов с противоопухолевой активностью известен стерильный склероций трутовика скошенного (*Inonotus obliquus*) и спектром биологической активности экстрактов, соединений [12, 13].

¹ ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск, Российская Федерация

² ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, г. Иркутск, Российская Федерация

*e-mail: molodegny31@mail.ru

Противоопухолевая и антиметастатическая активность соединений изучена в отношении *I. obliquus*. Вторичные метаболиты других видов рода *Inonotus* исследовались в качестве противоопухолевых агентов мало. Соединение инонотусин-А из плодового тела *I. hispidus* имеет умеренную цитотоксичность против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7 с IC50 19.6 мкМ [14], а 3 α ,6 β -дигидроксициннамолид, выделенный из плодового тела *I. rickii*, показывает умеренную ингибирующую активность на клетках рака толстой кишки человека SW480 (IC50 20.4 мкМ) [15]. Известен противораковый эффект действия полисахаридов из *I. taiwanensis* [16].

Цель исследования – выявление противоопухолевых свойств фракций водорастворимых полисахаридов, выделенных из *I. rheades*, и оценка их активности при изменении освещения в процессе роста.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Базидиальный гриб *Inonotus rheades* штамм 287 получен из коллекции грибных культур ЦКП “Биоресурсный центр” СИФИБР СО РАН, который культивировали на древесных дисках и древесной стружке *Betula pendula* Roth (*Betulaceae*). Проводили экстракцию из обросшего мицелием субстрата, который был стерилизован, инокулирован мицелием *I. rheades*. Культивирование мицелия вели при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте и при освещении синими светодиодами мощностью 12.8 Вт/м² (“SMD-5050”, Рубикон, Барнаул, Россия). Из культивированного мицелия выделяли фракции водорастворимых полисахаридов (ВРПС) [17], перерастворяли стерильной бидистиллированной водой, рН титровали до значения 7.4 с помощью КОН, стерилизовали фильтрацией (d пор = 22 мкм). ВРПС содержали малое количество примесей, т.к. низкомолекулярные вещества были удалены диализом. По данным хроматографического анализа ВРПС были представлены 5 фракциями с молекулярной массой (25 кД–1.5 МДа) (неопубликованные данные). Моносахаридный состав фракций планируется исследовать после определения биологической активности. Изучали 4 экстракта ВРПС: ВР-5 – выделенные из мицелия, выращенного на древесных дисках при освещении синим светом; ВР-8, выращенного в аналогичных условиях на древесных стружках; ВР-6, выращенного в темноте на древесных дисках, и ВР-7, выращенного в аналогичных условиях на древесных стружках.

Противоопухолевые свойства ВРПС из мицелия *Inonotus rheades* изучали на белых беспородных мышках самцах 3-месячного возраста с массой тела 20–25 г. Эксперименты выполнялись по правилам гуманного обращения с животными и на основании разрешения Комитета по этике Ир-

кутского научного центра хирургии и травматологии № 04 от 23.04.2021 г

Моделирование опухолевого процесса проводили путем перепрививки культуры клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ), полученной в питомнике ГНЦ ВБ “Вектор”. Первая серия эксперимента: группа № 1 ($n = 10$), перепрививка АКЭ с однократным введением через сутки ВРПС мицелия *Inonotus rheades* ВР-7 в дозе 100 мг/кг; № 2 ($n = 10$), перепрививка АКЭ с однократным введением через сутки фракции мицелия; ВР-8 в аналогичной дозе, № 3 ($n = 10$), контроль, перепрививка АКЭ. Вторая серия: группа № 4 ($n = 10$), перепрививка АКЭ с однократным введением через сутки фракции мицелия ВР-5 в дозе 100 мг/кг; № 5 ($n = 10$), перепрививка АКЭ с однократным введением через сутки фракции мицелия ВР-6 в аналогичной дозе; № 6 ($n = 10$), контроль, перепрививка АКЭ.

Через 10 сут после перепрививки АКЭ из каждой группы было выведено для анализа 5 мышей и 5 были оставлены для наблюдения продолжительности жизни.

Оценку противоопухолевого эффекта фракций мицелия *Inonotus rheades* осуществляли по критериям:

1. Количество опухолевых клеток

Оценку среднего количества опухолевых клеток в 1 мл асцитной жидкости проводили при получении суспензии отмытых клеток АКЭ, разведенных физиологическим раствором, и анализа в камере Горяева, которую рассчитывали по формуле: $X = (A \times B \times C) / 80$, где: А – число клеток АКЭ в 80 квадратах, В – объем разведенной АКЭ, С – степень разведения, 80 – (5 больших квадратов, умноженных на 16 малых квадратов).

2. Оценка противоопухолевого эффекта по торможению роста опухоли (ТРО)

Степень торможения роста опухоли рассчитывали по формуле: $\text{ТРО} \% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}} / V_{\text{контроля}}) \times 100$, где: V – средний объем опухоли (мл) в опытной и контрольной группах, соответственно, на конкретный срок выведения животного из эксперимента.

Количественные критерии оценки торможения роста опухоли:

ТРО < 20%	0
ТРО < 20–50%	±
ТРО < 51–80%	+
ТРО < 81–90%	++
ТРО < 91–100% + < 50%	+++
ТРО < 91–100% + > 50%	++++

Таблица 1. Оценка эффективности влияния фракций ВРПС мицелия *Inonotus rheades* на развитие АКЭ (первая серия эксперимента)

Сроки забора материала	Группы животных / фракции мицеллия	Исследуемые критерии				
		Объем асцитной жидкости (мл)	Кол-во клеток АКЭ в 1 мл асцита	Продолжительность жизни (сутки)	Торможение роста опухоли (%)	Увеличение продолжительности жизни (%)
10 сут с момента прививки АКЭ	№ 1 фракция ВР-7 (n = 10)	10.2 ± 1.5	1723 ± 40*	17.0 ± 1.0*	18.4	–
10 сут с момента прививки АКЭ	№ 2 фракция ВР-8 (n = 10)	9.0 ± 0.5*	1378.2 ± 20	20.0 ± 0.5*	28.0	–
10 сут с момента прививки АКЭ	№ 3 контроль (АКЭ), (n = 10)	12.5 ± 0.5	1381.3 ± 15	24.0 ± 1.0		

ВР-7 культивирование в темноте на древесных стружках, ВР-8 культивирование при освещении синим светом на древесных стружках, * – по отношению к контролю АКЭ, $p < 0.05$.

Таблица 2. Оценка эффективности влияния фракций ВРПС мицелия *Inonotus rheades* на развитие АКЭ (вторая серия эксперимента)

Сроки забора материала	Группы животных / фракции мицелия	Исследуемые критерии				
		Объем асцитной жидкости (мл)	Кол-во клеток АКЭ в 1 мл асцита	Продолжительность жизни (дней)	Торможение роста опухоли (%)	Увеличение продолжительности жизни (%)
10-й день с момента прививки АКЭ	№ 4 фракция ВР-5 (n = 10)	7.0 ± 1.0	1925.0 ± 40*	11.0 ± 1.0	8.0	–
10-й день с момента прививки АКЭ	№ 5 фракция ВР-6 (n = 10)	5.3 ± 0.4*	1577.0 ± 25	20.0 ± 1.5	30.0	–
10-й день с момента прививки АКЭ	№ 6 контроль (АКЭ) (n = 10)	7.6 ± 0.5	1529.0 ± 20	21.0 ± 1.0		

ВР-5 культивирование при освещении синим светом на древесных дисках, ВР-6 культивирование в темноте на древесных дисках, * – по отношению к контролю АКЭ, $p < 0.05$.

3. Оценка противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни

Определялась средняя продолжительность жизни мышей (СПЖ, сутки) в группе, и рассчитывались показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ %) по формуле:

$$\text{УПЖ \%} = \frac{(\text{СПЖ}_{\text{опыта}} - \text{СПЖ}_{\text{контроля}}) / \text{СПЖ}_{\text{контроля}}}{\text{СПЖ}_{\text{контроля}}} \times 100,$$

где минимальный критерий активности увеличения продолжительности жизни составлял $\geq 25\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по оценке влияния фракций ВРПС мицелия *Inonotus rheades* на развитие АКЭ представлены в табл. 1.

Отмечено, что процент торможения роста опухоли, в группе № 2, составлял 28%, продолжительность жизни в среднем – 20 сут, что является объективным критерием отличия от группы № 1. В группе № 1 с фракцией ВР-7 торможение роста опухоли составило 18.4%, при этом продолжительность жизни животных в данных группах была ниже, чем в контроле. Количество клеток АКЭ

Таблица 3. Показатели биохимического анализа крови животных при оценке эффективности влияния фракций ВРПС мицелия *Inonotus rheades* на развитие АКЭ

Биохимический анализ крови							
Группа животных/ фракция ВРП мицелия	Общий белок (г/л)	Глюкоза (ммоль/л)	Креатинин (мкмоль/л)	АЛТ (ед/л)	АСТ (ед/л)	Мочевина (мкмоль/л)	Щелочная фосфа- таза (ед/л)
№ 1, ВР-5 ($n = 10$)	48.0 ± 2.2*	6.0 ± 1.1	32.4 ± 2.2	99.0 ± 8.9*	324.1 ± 45.8*	7.6 ± 0.9	14.2 ± 1.8*
№ 2, ВР-6 ($n = 10$)	41.0 ± 1.8*	4.4 ± 0.9	30.5 ± 1.9	117.5 ± 11.0*	384.3 ± 32.7*	6.8 ± 0.75	23.5 ± 2.4*
№ 3, ВР-7 ($n = 10$)	42.0 ± 1.4	4.0 ± 0.4	28.5 ± 1.8	63.3 ± 9.1	234.4 ± 36.9*	7.0 ± 0.6	18.4 ± 2.1*
№ 4, ВР-8 ($n = 10$)	48.0 ± 0.3*	1.7 ± 1.5	28.5 ± 1.5	79.6 ± 8.7	477.4 ± 49.7*	9.4 ± 0.8	19.9 ± 3.2*
№ 5, АКЭ (контроль) ($n = 10$)	41.0 ± 1.9	8.7 ± 2.7	32.8 ± 2.0	56.0 ± 3.6	283.4 ± 19.8	8.7 ± 0.64	40.9 ± 4.8
норма	55–57	4.2–7.0	20–31	50–55	110–130	6.1–7.4	115–128

АЛТ – аланинаминотрансфераза, АЛТ – аспаргатаминотрансфераза, * – по отношению к контролю АКЭ, $p < 0.05$.

в 1 мл асцита в группах не снижалось по отношению к контролю.

Данные по противоопухолевой активности ВРПС мицелия *Inonotus rheades* во второй серии эксперимента в табл. 2.

В группе № 5 с фракцией ВР-6 торможение роста опухоли достигало 30%, продолжительность жизни в среднем 20 дней, что является отличительным признаком от группы № 4. При введении фракции ВР-5 у животных наблюдалась аллергическая реакция с признаками отека Квинке. Через 1.5 сут без коррекции проявления нивелировались. Количество клеток АКЭ в 1 мл асцита в группах также не снижалось по отношению к контролю. Данные биохимии крови в исследуемых группах представлены в табл. 3.

По биохимическим показателям отмечалось снижение концентрации общего белка на фоне повышения показателей АЛТ, АСТ во всех группах и незначительного увеличения концентрации мочевины в группе № 4. В контрольной группе уровень глюкозы несколько превышал норму, при этом в других группах этот показатель соответствовал норме. В контрольной группе также отмечалось повышение в крови показателей креатинина, мочевины и АСТ. Предполагается, что фракции водорастворимых полисахаридов мицелия *Inonotus rheades* по уровню токсичности больше влияют на форменные элементы крови и функциональные показатели печени.

Полисахариды, как природные агенты, проявляющие иммуномодулирующую и противоопухолевую активность, активно изучаются [18], при этом механизмы их действия известны не в полной мере. Показано, что водорастворимый экстракт полисахаридов из *Inonotus taiwanensis* воз-

действует на клетки человеческой лейкемии ТНР-1 и U937 *in vitro*, через торможение клеточного цикла и апоптоз, опосредованным эндонуклеазой G и независим от продукции активных форм кислорода митохондриями [16]. Механизм действия очищенного полисахарида из плодовых тел *Lentinus edodes* с молекулярной массой 605.4 кДа связан с активацией иммунитета и усилением митохондриального пути апоптоза опухолевых клеток у мышей с привитой опухолью S180, при этом *in vitro* было продемонстрировано прямое действие этого полисахарида на опухолевые клетки MCF-7 и S180 [19]. В экспериментах с ВРПС из *Inonotus obliquus* показано отсутствие прямого действия на клетки опухоли *in vitro* и объективный эффект в экспериментах *in vivo*, на фоне повышения иммуномодулирующей активности [20]. Сегодня невозможно уверенно предполагать о прямом или непрямом механизме действия ВРПС мицелия *Inonotus rheades* на клетки АКЭ в проведенном исследовании.

Таким образом, выявлено, что фракции ВРПС мицелия *Inonotus rheades* обладают противоопухолевым эффектом, продемонстрированным на модели АКЭ, при этом наиболее активные в этом аспекте, фракции ВР-6 и ВР-8, выращенные в различных условиях (в темноте и при облучении синим светом) и на различных подложках культивирования. Показано, что при использовании древесных дисков весь мицелий находится на пути светового потока, тогда как при использовании стружки большая часть мицелия укрыта непрозрачной древесиной от света, что, по-видимому, приводит к изменению биохимической составляющей мицелия в этих зонах. Предполагается, что мицелий, выращенный на стружках в

темноте, также проявляет меньшую, противоопухолевую активность. Возможно, при непрерывном освещении синим светом противоопухолевые ВРПС, синтезируемые при метаболизировании древесины березы, трансформируются в неактивную форму, в то же время если освещена только часть мицелия, происходит дополнительная стимуляция накопления биологически активных веществ. Необходимо отметить, что противоопухолевый эффект фракций мицелия отмечался при введении однократной дозы. Тем не менее у фракции ВР-6 и ВР-8 выявлен противоопухолевый эффект по показателям объема асцитной жидкости и торможения роста опухоли, что безусловно определяет их как перспективные объекты дальнейших исследований.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Иркутской области в рамках научного проекта № 20-44-380010.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Purschwitz J., Müller S., Kastner C., Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi // *Current Opinion in Microbiology*. 2006. V. 9. Issue 6. P. 566–571.
2. Herrera-Estrella A., Horwitz B.A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception // *Molecular Microbiology*. 2007. V. 64. Issue 1. P. 5–15.
3. Поединок Н.Л., Ефременкова О.В., Михайлова О.Б., Негрыко А.М. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий // *Успехи медицинской микологии*. 2007. Т. 9. С. 176–178.
4. Manachere G. Research on the fruiting rhythm of a basidiomycete mushroom *Coprinus congregatus* Bull. Ex Fr. // *Journal of interdisciplinary cycle research*. 1971. V. 2. Issue 2. P. 199–209.
5. Nakano Y., Fujii H., Kojima M. Identification of blue-light photoresponse genes in Oyster Mushroom mycelia // *Biochemistry & Molecular Biology Communications*. 2010. V. 74. Issue 10. P. 2160–2165.
6. Mei X.-L., Zhao Z., Chen X.-D., Lan J. Light quality regulation of growth and endogenous IAA metabolism of *Ganoderma lucidum* mycelium // *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013. V. 38. Issue 12. P. 1887–1892.
7. Zheng W., Miao K., Liu Y., Zhao Y., Zhang M., Pan S., Dai Y. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production // *Applied microbiology and biotechnology*. 2010. V. 87. Issue 4. P. 1237–1254.
8. Poyedinok N.L., Mykhailova O.B., Shcherba V.V., Buchalo A.S., Negryko A.M. Light regulation of growth and biosynthetic activity of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), in pure culture // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2008. V. 10. Issue 4. P. 369–378.
9. Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Miao K., Jiang H. NMR-based metabolomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus* // *Bioresource Technology*. 2009. V. 100. Issue 19. P. 4481–4487.
10. Gornostai T.G., Borovskii G.G., Kashchenko N.I., Olenikov D.N. Phenolic Compounds of *Inonotus rheades* (Agaricomycetes) Mycelium: RP-UPLC-DAD-ESI/MS Profile and Effect of Light Wavelength on the Styrylpyrone Content // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2018. V. 20. Issue 7. P. 637–645.
11. Borovskii G.B., Gornostai T.G., Polyakova M.S., Borovskaja M.K., Khasnatinov M.A., Solovarov I.S., Danchinova G.A. Impact of blue light on the biological properties of aqueous extracts during the cultivation of the *Inonotus rheades* mycelium // *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021. V. 11. № 1. P. 80–89. (In Russian)
12. Zhong X., Ren K., Lu S.J., Yang S.Y., Sun D.Z. Progress of research on *Inonotus obliquus* // *Chinese journal of integrative medicine*. 2009. V. 15. Issue 2. P. 156–160.
13. Balandaykin M.E., Zmitrovich I.V. Review on Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes): realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential // *Int. J. Med. Mushrooms*. 2015. V. 17. Issue 2. P. 95–104.
14. Zan L.F., Qin J.C., Zhang Y.M., Yao Y.H., Bao H.Y., Li X. Antioxidant hispidin derivatives from medicinal mushroom *Inonotus hispidus* // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2011. Vol. 59. Issue 6. P. 770–772.
15. Chen H.P., Dong W.B., Feng T., Yin X., Li Z.H., Dong Z.J., Li Y., Liu J.K. Four new sesquiterpenoids from fruiting bodies of the fungus *Inonotus rickii* // *Journal of Asian natural products research*. 2014. V. 16. Issue 6. P. 581–586.
16. Chao T.L., Wang T.Y., Lee C.H., Yiin S.J., Ho C.T., Wu S.H., You H.L., Chern C.L. Anti-cancerous effect of *Inonotus taiwanensis* polysaccharide extract on human acute monocytic leukemia cells through ROS-independent intrinsic mitochondrial pathway // *International journal of molecular sciences*. 2018. V. 19. Issue 2. P. 393.
17. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Смирнов Д.А., Поединок Н.Л. Влияние условий глубинного культивирования лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (Рейши) на образование полисахаридов. Биотехнология. 2007. Т. 6. С. 34–41.
18. Zong A., Cao H., Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research // *Carbohydrate polymers*. 2012. V. 90. № 4. P. 1395–1410.
19. Zhang Y., Li Q., Shu Y., Wang H., Zheng Z., Wang J., Wang K. Induction of apoptosis in S180 tumour bearing mice by polysaccharide from *Lentinus edodes* via mitochondria apoptotic pathway // *Journal of Functional Foods*. 2015. V. 15. P. 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.025>
20. Fan L., Ding S., Ai L., Deng K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus* // *Carbohydrate Polymers*. 2012. V. 90. № 2. P. 870–874. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.013>

ANTITUMOR PROPERTIES OF AQUEOUS EXTRACTS FROM *INONOTUS RHEADES* MYCELIUM AND THEIR EVALUATION UNDER VARIOUS CULTIVATION CONDITIONS

G. B. Borovskii^a, T. G. Gornostai^a, M. S. Polyakova^a, E. A. Lozovskay^{b,#}, and S. B. Nikiforov^b

^a Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation

^b Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russian Federation

[#]e-mail: molodegny31@mail.ru

Presented by Academician of the RAS B.A. Trofimov

The antitumor properties of aqueous extracts of *Inonotus rheades* basidiomycetes mushroom were evaluated when cultured on wood discs and wood shavings (birch) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in darkness and under constant illumination with 12.8 W/m^2 blue light. The aqueous fraction containing water-soluble polysaccharides was isolated and analyzed: BP-5 fraction cultured on wood discs under blue light illumination; BP-8 fraction grown under similar conditions on wood shavings; BP-6 fraction grown in the dark on wood discs; BP-7 fraction grown under similar conditions on wood shavings. Antitumor effects of the extracts were carried out on the model of Ehrlich ascites carcinoma in mice. It was found that the extracts isolated from the basidial fungus *Inonotus rheades* exhibit antitumor properties, with their accumulation during growth determined by different conditions of cultivation.

Keywords: *Inonotus rheades*, water-soluble polysaccharides, antitumor activity, cultivation, blue light effect

УДК 543.645.9

НАНОКОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ ЯДРА ПРИРОДНОГО КЛИНОПТИЛОЛИТА И ОБОЛОЧКИ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА

© 2022 г. А. Г. Погорелов^{1,*}, А. И. Панаит¹, А. А. Гулин², А. А. Станкевич¹, В. Н. Погорелова¹,
член-корреспондент РАН Г. Р. Иваницкий¹

Поступило 25.02.2022 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принято к публикации 08.04.2022 г.

Разработана наноконструкция посредством нанесения слоя фосфатидилхолина на поверхность частицы природного клиноптилолита. Формирование оболочки, эффективный размер которой не превышает толщины молекулярного слоя фосфолипида, подтверждено с помощью UV спектрометрии и молекулярной масс-спектрометрии. Гидродинамический диаметр готовой конструкции, определенный методом динамического рассеяния света, меньше, чем у исходного ядра. Предполагается, что такой эффект обусловлен наличием фосфолипидного покрытия, которое снижает силу сопротивления водной среды. Наноразмер полученной конструкции, ядро натурального клиноптилолита и фосфолипидная оболочка представляют сочетание полезных качеств, которые могут быть востребованы при создании многофункциональной платформы для доставки биологически активных веществ, биоимиджинга или в качестве основы биосенсора.

Ключевые слова: клиноптилолит, фосфатидилхолин, UV спектрометрия, времяпролетная спектрометрия вторичных ионов (ToF-SIMS), динамическое рассеяние света, сканирующая электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S2686738922040114

Почти 40% разрабатываемых лекарственных веществ получают в нерастворимом в воде виде, когда наиболее эффективным является способ доставки вещества через желудочно-кишечный тракт. В данном случае неорганические пористые материалы используют в качестве наноядра для транспортировки физиологически активных веществ [1–3]. С этой целью в ряду перспективных материалов рассматривают цеолит, нанокристаллы которого синтезируют в лабораторных условиях [4–7]. Альтернативой синтетическому продукту может быть природный минерал. Из семейства природных цеолитов в биомедицинских целях наиболее востребованным остается клиноптилолит [8, 9].

При разработке дизайна платформы на основе твердого материала особое внимание уделяют оболочке, для чего используют фосфолипиды, например, фосфатидилхолин (ФХ) – основной

ингредиент клеточной мембраны. Популярность ФХ обусловлена наличием полезных качеств: отсутствие токсичности, биodeградability, биосовместимость, самоорганизация структуры, амфифильность, стабилизация дисперсной системы. Предложен способ нанесения оболочки посредством взаимодействия неорганических наночастиц с водной эмульсией ФХ или его производных [1, 10]. Учитывая полезные свойства ФХ и клиноптилолита, комбинацию этих материалов можно рассматривать в качестве перспективной наноплатформы. Обзор доступной литературы показывает отсутствие работ, направленных на создание такой композиции. Поэтому цель данной работы состояла в том, чтобы оценить эффективность адсорбции ФХ ядром природного клиноптилолита и изучить свойства полученной конструкции.

Процедура формирования комплекса наночастицы клиноптилолита и ФХ описана ранее [11]. Кратко, на конечном этапе получения наноядра критическими условиями являются растирание пудры при низких температурах и последующий нагрев готового продукта до комнатной температуры в условиях высокого вакуума. Экстракт пищевой добавки E322 (Cargill Lecigran 1000P, Германия) в этиловом спирте (0.64 мг/мл) использовали в качестве источника ФХ. Слой фос-

¹ ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУН ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: agpogorelov@rambler.ru

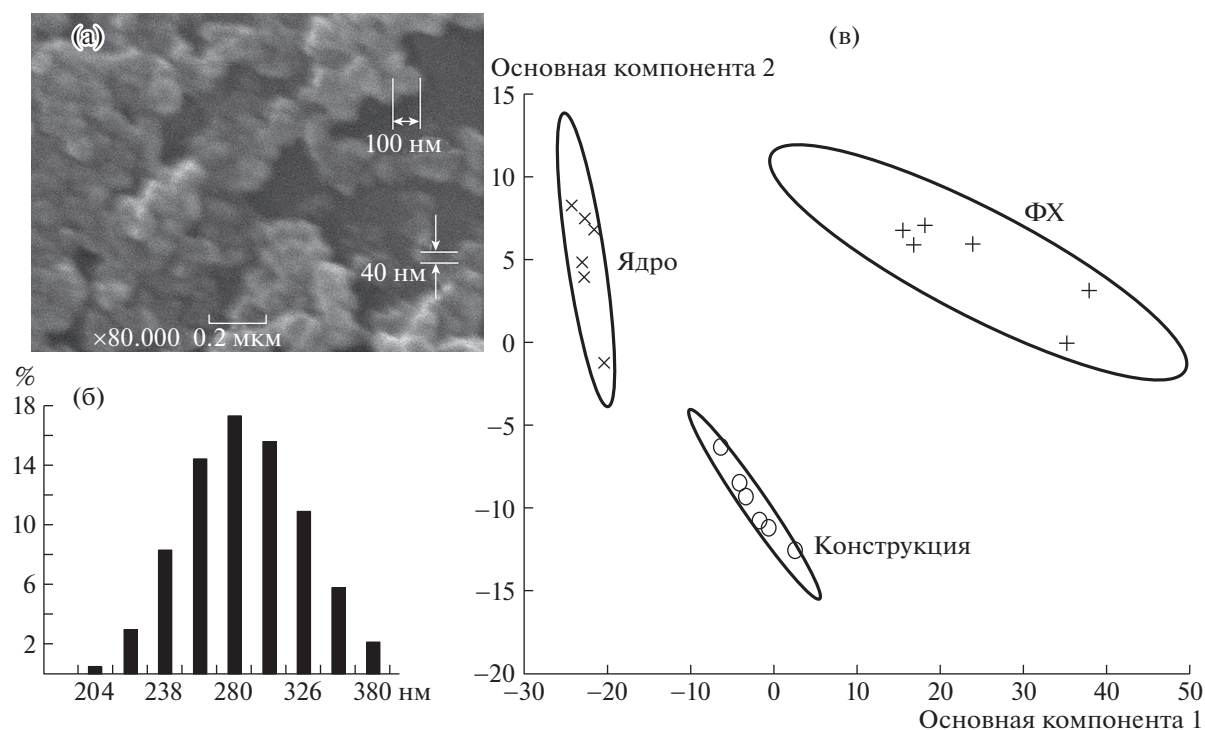


Рис. 1. (а) микрофотография наночастиц натурального клиноптилолита, изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии (режим вторичных электронов), (б) гистограмма значений гидродинамического диаметра для наночастиц клиноптилолита, (в) сравнение методом PCA масс-спектров фосфатидилхолина (ФХ), образцов наночастиц клиноптилолита (ядро) и готовой наноконструкции (конструкция). Очерчены данные с доверительным интервалом 95% для 6 измерений в каждой группе.

фолипида на ядра наносили посредством инкубации наночастиц клиноптилолита в спиртовом экстракте ФХ. После центрифугирования полученной суспензии отбирали супернатант, а к осадку добавляли дистиллированную воду с тем, чтобы отмыть этанол и не связанный ФХ, а также стабилизировать наноконструкцию. Для изучения свойств полученного нанопродукта использовали сканирующую электронную микроскопию (SEM), метод динамического рассеяния света, времяпролетную масс-спектрометрию вторичных ионов (ToF-SIMS), UV – спектрометрию раствора ФХ в этаноле.

Качественный анализ адсорбции ФХ

Используемый фосфолипид представляет собой нейтральный диэлектролит, поэтому формирование оболочки наноядра возможно за счет взаимодействия ФХ и фиксированных зарядов на поверхности частиц клиноптилолита. Размер исходного ядра составляет десятки нанометров (рис. 1а), а его гидродинамический диаметр варьирует в диапазоне 200–410 нм (рис. 1б). Различие в указанных величинах может означать то, что свойства поверхности частиц клиноптилолита не соответствуют модели гладкой сферической частицы, которую применяют для оценки результатов метода динамического рассеяния света.

Наличие оболочки на поверхности ядра анализировали посредством метода ToF-SIMS [12], который используют для анализа органической пленки, толщиной нескольких молекулярных слоев [13]. Сравнивали препараты экстракта ФХ, наночастиц клиноптилолита без оболочки или наночастиц, обработанных экстрактом ФХ. Значимость различий между масс-спектрами оценивали в программе NB Toolbox посредством метода PCA (principal component analysis) [14]. Видно (рис. 1в), что области данных ToF-SIMS не перекрываются, что свидетельствует о значимом различии в молекулярном составе сравниваемых образцов. Результаты масс-спектрометрии однородных по составу образцов фосфолипида и наночастиц клиноптилолита находятся в разных полуплоскостях горизонтальной оси. При этом область данных полученной наноконструкции занимает промежуточное положение, что свидетельствует о модификации поверхности наноядра в результате адсорбции на его поверхность ФХ. Различие между масс-спектрами фосфолипида и конструкции отражает то, что толщина оболочки меньше глубины проникновения пучка первичных ионов. В этом случае одновременно ионизируются ядро и материал покрытия. С учетом поперечного разрешения метода ToF-SIMS этот ре-

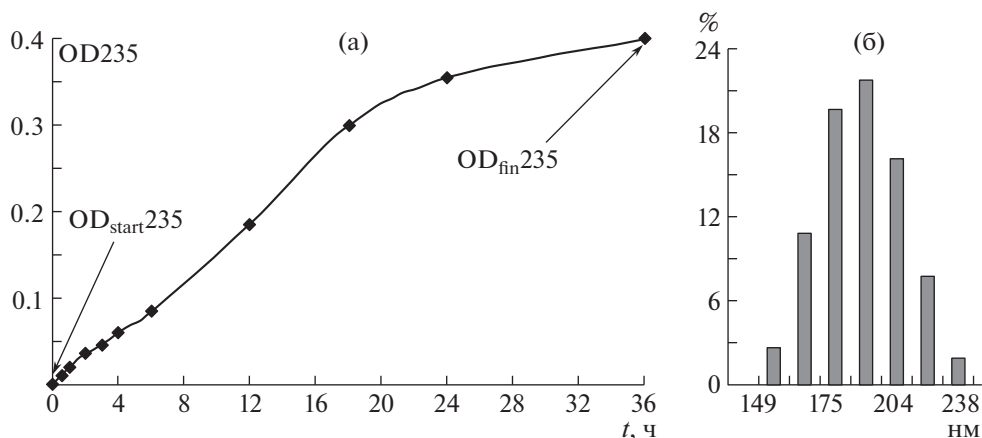


Рис. 2. (а) Изменение со временем оптической плотности на длине волны 235 нм характерного спектра поглощения этилового спирта при растворении в нем оболочки ФХ, покрывающей ядро клиноптилолита, (б) гистограмма значений гидродинамического диаметра для частиц наноконструкции, содержащей ядро натурального клиноптилолита и оболочку фосфатидилхолина. Обозначения: $D_{start235}$ – оптическая плотность этилового спирта, D_{fin235} – оптическая плотность этилового спирта после растворения в нем оболочки наноконструкции.

зультат позволяет оценить толщину оболочки величиной, не превышающей нескольких нанометров.

Анализ эффективности адсорбции ФХ

Перенос готовой конструкции обратно в этиловый спирт приводит со временем к растворению оболочки, что сопровождается увеличением оптической плотности на длине волны 235 нм (OD 235) характерного спектра поглощения раствора ФХ в этаноле (рис. 2а).

Используя результаты UV спектрометрии (рис. 2а), можно определить эффективность адсорбции ФХ частицами клиноптилолита (параметр “ η ”), т.е. количество адсорбированного фосфолипида на единицу веса клиноптилолита, что определяют из выражения (1)

$$\eta = K(OD_{fin235})V/M_{core}, \tag{1}$$

где K – эмпирический коэффициент пропорциональности для калибровочной прямой зависимости между концентрацией растворенного ФХ и оптической плотностью раствора; OD_{fin235} – оптическая плотность спиртового раствора после растворения в нем оболочки ФХ; V – объем этилового спирта, в котором происходит десорбция оболочки; M_{core} – вес исходной порции частиц клиноптилолита, которую брали для формирования наноконструкции.

При заданных величинах ($K = 0.8$ мг/мл, $OD_{fin235} = 0.4$, $V = 4$ мл, $M_{core} = 20$ мг) в выражении (1) параметр η принимает значение 0.062. Если принять допущение о сферической форме ядра и о равномерном распределении адсорбированного материала на поверхности ядра, то толщину слоя ФХ можно оценить из выражения (2)

$$\Delta = \eta r(\rho_{core}/3\rho_{shell}), \tag{2}$$

где: Δ – толщина оболочки конструкции, r – эффективный радиус ядра, ρ_{core} и ρ_{shell} – плотность материала ядра и оболочки соответственно.

Подставляя в выражение (2) известные значения параметров ($\eta = 0.062$, $r = 70$ нм, $\rho_{core} = 2$ г/см³, $\rho_{shell} = 1.16$ г/см³), рассчитываем толщину оболочки, которая оценивается величиной ~2.5 нм, что соответствует толщине одного слоя фосфолипида. Такой расчет согласуется с прогнозом, полученным на основе данных метода ToF-SIMS.

Гидродинамические свойства наноконструкции

Гидродинамический диаметр полученной наноконструкции варьирует в диапазоне 150–240 нм с максимумом в области 190 нм (рис. 2б). Отметим, гидродинамический диаметр всей конструкции заметно меньше аналогичной характеристики для ядра с максимумом в области 280 нм (рис. 1б). Другими словами, наличие оболочки ФХ вызвало уменьшение гидродинамического размера конструкции, что можно ошибочно интерпретировать как уменьшение реального размера частицы. Данный эффект, по-видимому, обусловлен снижением сопротивления водной среды для готовой конструкции с фосфолипидным покрытием по сравнению с исходным клиноптилолитовым ядром, обладающим шероховатой поверхностью. Теоретические аспекты влияние оболочки на подвижность наночастицы рассматривают в обзор [15].

Таким образом, в данном исследовании посредством нескольких аналитических методов подтверждено формирование оболочки фосфатидилхолина на поверхности наночастицы клиноптилолита. Наноразмер полученной конструкции, ядро натурального клиноптилолита и фосфоли-

пидная оболочка представляют привлекательное сочетание полезных качеств, которые могут быть востребованы при создании многофункциональной платформы, например, для доставки биологически активных веществ, биоимиджинга или в качестве основы биосенсора.

В завершение можно сделать следующие выводы. Получен новый вид наноконструкции на основе ядра натурального клиноптилолита с оболочкой из фосфатидилхолина. Используя результаты UV-спектрометрии, оценена толщина (~2.5 нм) оболочки, которая не превышает одного слоя фосфолипида. После нанесения оболочки фосфатидилхолина гидродинамический диаметр (190 нм) наноконструкции становится меньше гидродинамического диаметра (280 нм) исходного ядра. Полученные данные позволяют предположить то, что адсорбции фосфолипида модифицируют поверхность наночастицы клиноптилолита, уменьшая силу сопротивления окружающей водной среды.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

В части развития подходов анализа фосфолипидов посредством ToF-SIMS и UV спектрометрии исследование выполнено при поддержке Российского научно-го фонда (проект № 20-16-00019).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldassarre F., Allegretti C., Tessaro D., et al. // *Chemistry Select*. 2016. V. 1. P. 6507–6514.
2. Stefanache A., Ignat M., Peptu C.A., et al. // *Appl. Sci*. 2017. V. 7. P. 237–250.
3. Yu X., Khalil A., Dang P.N., et al. // *Adv. Funct. Mater*. 2014. V. 24. P. 3082–3093.
4. Johnson E.B.G., Arshad S.E. // *Appl. Clay Sci*. 2014. V. 98. P. 215–221.
5. Mintova S., Grand J., Valchev V. // *CR Chimie*. 2016. V. 19. P. 183–191.
6. Tosheva L., Belkhair S., Gackowski M., et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017. V. 157. P. 254–260.
7. Bertucci A., Lülfi H., Septiadi D., et al. // *Adv. Healthcare Mater*. 2014. V. 3. P. 1812–1817.
8. Bacakova L., Vandrovцова M., Kopova I., et al. // *Biomater. Sci*. 2018. V. 6. P. 974–989.
9. Mastinu A., Kumar A., Maccarinelli G., et al. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 1517–1531.
10. Hellman P., Andersson L., Eriksson H. // *Cellular Immunology*. 2009. V. 258. P. 123–130.
11. Pogorelov A.G., Stepanova T.A., Panait A.I. et al. // *Biophysics*. 2020. V. 65. P. 742–746.
12. Mahoney C.M. // *Mass Spectrometry Reviews*. 2010. V. 29. P. 247–293.
<https://doi.org/10.1002/mas>
13. Bolbach G., Viari A., Galera R., et al. // *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*. 1992. V. 112. P. 93–100.
14. Graham D.J., Castner D.G. // *Biointerphases*. 2012. V. 7. P. 49–61.
15. Doane T.L., Chuang C.-H., Hill R.J., et al. // *Accounts of chemical research*. 2012. V. 45. P. 317–326.

NATURAL CLINOPTILOLITE NANO PARTICLES COATED WITH PHOSPHATIDYLCHOLINE

A. G. Pogorelov^{a, #}, A. I. Panait^a, A. A. Gulin^b, A. A. Stankevich^a,
V. N. Pogorelova^a, and Corresponding Member of the RAS G. R. Ivanitskii^a

^a *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science,
Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, Russian Federation*

^b *Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: agpogorelov@rambler.ru*

A nano-carrier has been formulated by coating the phosphatidylcholine layer on the natural clinoptilolite particle surface. The shell effective size does not exceed the thickness of the phospholipid molecular layer that has been confirmed by UV spectrometry and molecular mass spectrometry. The formulated nano-carrier hydrodynamic diameter determined by dynamic light scattering is smaller than the clinoptilolite core size. This effect is assumed to be caused by the phospholipid shell, which reduces the aqueous medium friction. The nano-size of the formulated nano-carrier, the natural clinoptilolite core and the phospholipid shell together allow a combination of fruitful features that can be used for the fabrication of multifunctional platforms as the biologically active substances delivery, bioimaging or biosensors.

Keywords: clinoptilolite core, phosphatidylcholine, UV spectrometry, time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS), dynamic light scattering, scanning electron microscopy

УДК 611.1:616.8:159.91

ФАКТОРЫ РИСКА И МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА У КРЫС ВИСТАР В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССУ И ВОЗРАСТА

© 2022 г. М. В. Кондашевская^{1,*}, В. Э. Цейликман², М. В. Комелькова^{2,3}, П. Н. Попков⁴,
М. С. Лапшин², П. О. Платковский², О. Б. Цейликман^{2,5}, С. А. Федоров²,
М. В. Черешнева³, академик РАН В. А. Черешнев³

Поступило 25.01.2022 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принято к публикации 17.03.2022 г.

Статья посвящена актуальной проблеме – изучению механизмов патогенеза посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), заболевания, связанного из-за пандемии коронавируса с психологическим стрессом. К важнейшим задачам экспериментальной и практической медицины относится поиск молекулярных механизмов, лежащих в основе причин развития этого заболевания у одних индивидов, или особей, и устойчивости других. Авторами получены приоритетные данные, свидетельствующие, что при моделировании ПТСР причиной расстройства деятельности миокарда у неустойчивых к стрессу молодых и старых крыс Вистар является нарушение синтеза, метаболизма и, главным образом, смена доминирования транспортных форм энергии – глюкозы и липидов. Применение гистохимических реакций и поляризационной микроскопии позволило выявить дефицит энергетических запасов в кардиомиоцитах, признаки возникновения зон ишемии и гипоксии в миокарде, обусловленные накоплением НАДН и НАДФН, инициирующих избыточную продукцию активных форм кислорода.

Ключевые слова: крысы Вистар, посттравматическое стрессовое расстройство, устойчивость, неустойчивость к стрессу, транспортные формы энергии, миокард

DOI: 10.31857/S2686738922040084

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцина”, Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)”, Челябинск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Южно-Уральский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Челябинский государственный университет”, Челябинск, Россия

*e-mail: marivladiko@mail.ru

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) – тяжелое психическое заболевание, возникающее в результате единичных или повторяющихся инцидентов, оказывающих негативное воздействие огромной мощности на психику индивида. В большинстве случаев проявление ПТСР имеет отложенный характер и характеризуется нарушениями психического здоровья, которое отягощено развитием соматической патологии. В силу различных причин, одной из которых является наследственная восприимчивость к стрессу, ПТСР развивается не у всех индивидов [1]. Среди сцепленных с ПТСР болезней часто отмечаются заболевания сердечно-сосудистой системы и др., связанные не только с нейроэндокринными нарушениями, но и с расстройствами обмена аминокислот, липидов, резистентностью к инсулину и т.д. [2]. Однако до сих пор не установлены особенности метаболизма и энергетики у неустойчивых и устойчивых к стрессу индивидов, или особей разного возраста.

Цель исследования – при моделировании посттравматического стрессового расстройства определить морфофункциональное состояние миокарда, а также особенности липидного профиля транспортных форм энергии неустойчивых и устойчивых к стрессу молодых и старых крыс Вистар.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы половозрелые самцы крыс Wistar, в возрасте 5.5–6.0 мес ($n = 60$, масса тела 210–230 г) и 21.6–23.8 мес ($n = 60$, масса тела 670–850 г). Животных содержали в стандартных условиях вивария. Доступ к воде и стандартному полноценному гранулированному корму был свободным.

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) воспроизводили, используя общепризнанную модель предаторного стресса – страха грызунов перед хищником и его запахом. Кошачью мочу предъявляли крысам в течение 10 сут, 10 мин/день с последующим содержанием в течение 14 сут в обычных условиях вивария. У всех крыс регистрировали поведенческие и биохимические показатели до моделирования ПТСР и в конце эксперимента, производили анализ морфологических и морфометрических показателей миокарда. Все экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с директивой Европейского парламента 2010/63/EU “О защите животных, используемых в экспериментальных целях” (от 22.09.2010 г.).

Для выявления поведенческих проявлений развития ПТСР животных тестировали в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ, 600 с). Вычисляли индекс тревожности, разработанный Н. Cohen и соавт. [3]: $ИТ = 1 - [(ВОР/ВТ + ЧЗОР/ОЧЗ)/2]$, где ВОР – время, проведенное в открытых рукавах, ВТ – время тестирования 600 с, ЧЗОР – число заходов в открытые рукава ПКЛ, ОЧЗ – общее число заходов в рукава ПКЛ.

Для биохимических исследований кровь забирала утром натощак. Концентрацию кортикостерона в сыворотке крови определяли методом ИФА (IBL, Германия). Используя биохимический анализатор крови CardioChek PA (США), определяли уровень глюкозы, общего холестерина (ОХ), холестерина – класса липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), холестерина – класса липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов. Рассчитывали содержание холестерина класса липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). $ЛПОНП = ТГ/2.2$ [4], коэффициент атерогенности (КА) по формуле: $КА = (ОХ - ЛПВП)/ЛПВП$, а также индекс Castelli (IC) $IC = ОХ/ЛПВП$ [5, 6].

Для гистоморфологического анализа брали образцы миокарда левого желудочка, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоженные образцы заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Для поляризационной микроскопии использовали неокрашенные гистологические срезы, с целью выявления гликогена, выполняли ШИК-реакцию. При помощи микроскопа Axioplan 2 imaging с цифровой фотокамерой и системой обработки изображений (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия), производили по 10 фотографий окрашенных и 10 не окрашенных срезов миокарда каждого животного. Оптическую плотность срезов определяли, используя программу ImageJ (Fiji). Все изображения были получены при равных условиях, используемые величины были относительными, значения выражены в пикселях.

Сравнение экспериментальных групп производили при помощи ANOVA, критерия Краскела–Уоллиса для множественных сравнений, U-критерия Манна–Уитни для парных сравнений. Результаты выражали как Me (Qн; Qв) – медиана, нижний и верхний квартили. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте позволило установить, что основной, комплексный, показатель поведения – индекс тревожности неустойчивых к стрессу животных был статистически значимо выше, чем устойчивых, даже до моделирования ПТСР ($p < 0.01$, рис. 1). Второе тестирование, проводимое после стрессирования, позволило зарегистрировать повышение значений индекса тревожности на 23.1% у неустойчивых к стрессу крыс обеих возрастных групп ($p < 0.01$), тогда как индекс тревожности устойчивых особей не отличался от контроля ($p > 0.05$, рис. 1). На основании дискриминантного анализа показателей индекса тревожности интактных и стрессированных животных, также, как и в наших предыдущих экспериментах, крыс с индексом тревожности больше 0.80 мы считали неустойчивыми, а особей с индексом тревожности меньше 0.80 – устойчивыми к стрессу [7].

УМИ – устойчивые к стрессу молодые интактные крысы; НМИ – неустойчивые молодые интактные крысы; УМПТСР – устойчивые молодые крысы при моделировании ПТСР; НМПТСР – неустойчивые молодые крысы при моделировании ПТСР; УСИ – устойчивые старые интактные крысы; НСИ – неустойчивые старые интактные крысы; УСПТСР – устойчивые старые крысы при моделировании ПТСР; НСПТСР – неустойчивые старые крысы при моделировании ПТСР. ЧЗОР – число заходов в открытые рукава припод-

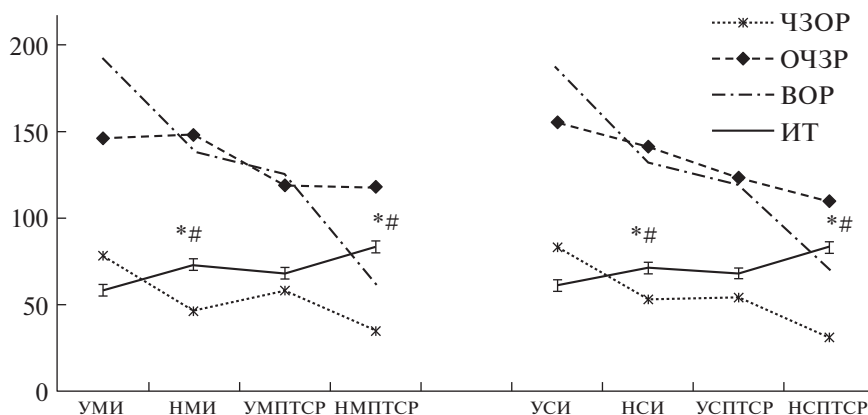


Рис. 1. Показатели поведения устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс Вистар разных возрастов при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).

нятого крестообразного лабиринта (значения с коэффициентом 10^1); ОЧЗР – общее число заходов в рукава (с коэффициентом 10^1); ВОР – время, проведенное в открытых рукавах; ИТ – индекс тревожности (с коэффициентом 10^2). * $p < 0.01$ – отличия показателей индекса тревожности от исходных значений; # $p < 0.01$ – отличия показателей индекса тревожности между устойчивыми и неустойчивыми подгруппами.

Дополнительным подтверждением того, что после предаторного стресса у крыс развилось ПТСР-подобное состояние, служили показатели уровня кортикостерона, которые снижались в обеих возрастных группах ($p < 0.01$, табл. 1). Необходимо заметить, что показатели уровня кортикостерона различались между подгруппами устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс даже до стрессирования. По сравнению с устойчивыми к стрессу крысами, молодые и старые неустойчивые особи характеризовались более высокими значениями уровня кортикостерона (табл. 1).

Результаты липидного профиля крови крыс, представленные в таблице, демонстрируют повышенный уровень проатерогенных (для людей) факторов даже у интактных неустойчивых подгрупп, чем устойчивых ($p < 0.01$). После моделирования ПТСР эти различия усугубляются ($p < 0.01$). Стоит напомнить, что у крыс липидный профиль изменяется не столь значительно, как у людей, и не развиваются проявления атеросклероза. В связи с этим, для большей информативности и возможности экстраполяции полученных данных на человека, мы регистрировали и рассчитывали несколько больший спектр показателей, чем в работах других авторов.

При сравнении коэффициента атерогенности и индекса Castell, последний оказался более чувствительным к условиям эксперимента. Значения индекса Castell были повышены у всех под-

групп старых крыс, а также у молодых низкоустойчивых животных ($p < 0.001$), тогда как значения коэффициента атерогенности выявили повышение только у старых стрессированных особей ($p < 0.001$). Показатели отношения уровня глюкозы к уровню триглицеридов оказались наиболее информативными, что позволяет анализировать эффекты и масштабность воздействия факторов, индуцирующих смену доминирования основного источника транспортной формы энергии в норме – глюкозы на липидный. Преобладание мобилизации свободных жирных кислот обычно наблюдается в пожилом возрасте, а также при действии экстремальных факторов [8]. В нашем эксперименте резкое и значительное изменение наблюдается при моделировании ПТСР в обеих возрастных группах, а также у интактных старых крыс обеих подгрупп. Основным органом, участвующим в синтезе и метаболизме обоих видов энергии – глюкозы и липидов, является печень. Судя по нашим предыдущим работам, установленное биохимическими методами изменение содержания в крови транспортных форм энергии является отражением нарушения метаболизма глюкозы и липидов в печени [9]. Выявленные в нашем эксперименте изменения липидного профиля, особенно у неустойчивых к стрессу крыс, в совокупности с расстройством морфофункционального состояния печени, не вызывая атеросклеротических повреждений у лабораторных грызунов, тем не менее, могут являться важными факторами развития сердечно-сосудистых нарушений.

В связи с этим мы изучали морфофункциональное состояние миокарда устойчивых и неустойчивых к стрессу, молодых и старых крыс. Установлено, что в норме показатели оптической плотности срезов, исследуемых при помощи поляризационной микроскопии, а также при использовании ШИК-реакции на содержание гли-

Таблица 1. Биохимические показатели крови устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс Вистар разных возрастов при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР)

Группы/Показатели	Молодые интактные		Молодые модель ПТСР		Старые интактные		Старые модель ПТСР	
	ВУ	НУ	ВУ	НУ	ВУ	НУ	ВУ	НУ
	КОРТ, нмоль/л	325.2 (282.5; 358.1)	387.9 [#] (362.5; 421.4)	263.3* (242.6; 308.9)	137.3** (104.1; 155.8)	307.43 (282.1; 331.2)	355.7 [#] (318.8; 397.7)	272.9 (256.4; 319.5)
Общий холестерин, моль/л	3.33 (2.96; 3.56)	3.62 [#] (3.26; 3.81)	3.88* (3.57; 4.09)	4.26** (3.85; 4.57)	3.83 [^] (3.51; 4.18)	3.92 [^] (3.67; 4.32)	4.49 [^] (4.05; 4.78)	5.32 ^{#^} (4.88; 5.58)
ЛПНП, моль/л	1.36 (1.22; 1.51)	1.79 [#] (1.53; 1.92)	2.10* (1.88; 2.31)	2.54** (2.29; 2.83)	2.23 [^] (2.01; 2.51)	2.30 [^] (2.12; 3.61)	3.04 [^] (2.83; 3.33)	3.81 ^{#^} (3.59; 4.11)
ЛПОНП, моль/л	0.31 (0.21; 0.35)	0.55 [#] (0.41; 0.69)	0.42* (0.35; 0.55)	1.03** (0.87; 1.25)	0.85 [^] (0.61; 1.04)	1.13 ^{#^} (0.90; 1.34)	1.09 [^] (0.90; 1.31)	1.35 ^{#^} (1.13; 1.61)
ЛПВП, моль/л	1.66 (1.47; 1.81)	1.49 (1.29; 1.77)	1.36 (1.18; 1.61)	1.11** (0.87; 1.34)	1.21 [^] (0.91; 1.44)	1.08 [^] (0.85; 1.32)	0.86 [^] (0.63; 1.09)	0.45 ^{#^} (0.24; 0.67)
ТГ, моль/л	0.69 (0.47; 0.78)	1.22 [#] (0.89; 1.51)	0.92* (0.77; 1.21)	2.26** (1.92; 2.74)	1.86 [^] (1.33; 2.29)	2.48 ^{#^} (1.98; 2.95)	2.39 [^] (1.97; 2.88)	2.96 ^{#^} (2.49; 3.55)
ГЛ, моль/л	3.4 (3.3; 3.5)	3.7 (3.4; 3.9)	3.6 (3.3; 3.9)	3.9** (3.6; 4.2)	3.6 (3.3; 3.9)	4.1 ^{#^} (3.9; 4.4)	3.9 [^] (3.6; 4.2)	4.6 ^{#^} (4.2; 4.9)
ГЛ/ТГ усл. ед.	4.9 (4.5; 7.0)	3.0 [#] (2.6; 3.8)	3.9* (3.2; 4.3)	1.7** (1.6; 1.9)	1.9 [^] (1.7; 2.5)	1.7 ^{#^} (1.5; 2.1)	1.8 [^] (1.5; 1.8)	1.5 ^{#^} (1.4; 1.7)
КА, усл. ед.	1.01 (0.97; 1.01)	1.43 [#] (1.09; 1.53)	1.85* (1.54; 2.03)	2.85** (2.41; 3.43)	2.17 [^] (1.90; 2.86)	2.58 ^{#^} (2.27; 3.32)	4.22 [^] (3.39; 5.43)	10.82 ^{#^} (7.33; 19.33)
ИС, усл. ед.	2.18 (1.97; 2.01)	2.60 [#] (2.15; 2.53)	2.85* (2.54; 2.63)	3.84** (3.41; 4.42)	3.17 [^] (2.90; 5.75)	3.63 ^{#^} (3.27; 4.32)	5.22 [^] (4.35; 6.42)	11.82 ^{#^} (8.33; 20.33)

ВУ – высокоустойчивые к стрессу животные, НУ – низкоустойчивые к стрессу животные, КОРТ – кортикостерон, ТГ – триглицериды, ГЛ – глюкоза, КА – коэффициент атерогенности, ИС – индекс Castelli. [#] $p < 0.05$ – отличие от своего исходного значения; ^{*} $p < 0.05$ – отличие между подгруппами ВУ и НУ; [^] $p < 0.05$ – отличие между группами молодых и старых крыс.

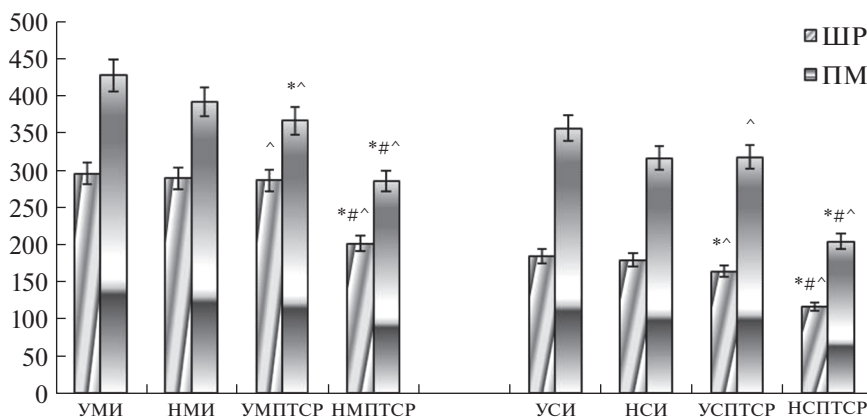


Рис. 2. Показатели оптической плотности содержания гликогена и поляризационной микроскопии миокарда устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс Вистар разных возрастов в норме и при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР).

когена, не имели отличий между подгруппами устойчивых и неустойчивых к стрессу крыс обеих возрастных групп ($p > 0.05$). Различия наблюдались только между старыми и молодыми животными: содержание гликогена у всех старых особей было заметно ниже, чем у молодых ($p < 0.001$, рис. 2). При моделировании ПТСР выраженное снижение уровня гликогена наблюдалось у молодых неустойчивых к стрессу животных ($p < 0.001$) по сравнению с контролем, тогда как у устойчивых особей значения уровня полисахарида оставались в пределах нормы ($p > 0.05$). В то же время у обеих подгрупп старых крыс после стрессирования оптическая плотность гликогена оказалась ниже возрастной нормы ($p < 0.001$), при этом наиболее низкие значения зарегистрированы у неустойчивых особей ($p < 0.001$, рис. 2).

Обозначения групп крыс те же, что и на рис. 1. ШР — значения оптической плотности гистологических срезов миокарда при выполнении ШИК-реакции на выявление гликогена, ПМ — значения оптической плотности гистологических срезов миокарда при использовании поляризационной микроскопии. * $p < 0.05$ — отличие от своего исходного значения; # $p < 0.05$ — отличие между подгруппами устойчивых и неустойчивых особей; ^ $p < 0.05$ — отличие между группами молодых и старых крыс.

Изучение срезов миокарда с помощью поляризационной микроскопии, выявляющей аутофлюоресценцию кардиомиоцитов, позволило установить, что по сравнению с нормой оптическая плотность снижалась при моделировании ПТСР у обеих подгрупп молодых животных, тогда как у старых крыс — только у неустойчивых к стрессу особей ($p < 0.001$, рис. 2). Наиболее низкими были значения неустойчивых животных, особенно старых ($p < 0.001$, рис. 2). Снижение оптической плотности, наблюдаемое при аутофлю-

оресценции кардиомиоцитов — давно известное явление, по которому судят о степени ишемического и/или гипоксического состояния миокарда. Одним из основных источников аутофлюоресценции являются нуклеотиды (пиридиновые и флавиновые), находящиеся в цитозоле и митохондриях кардиомиоцитов [10]. Накопление никотинамидадениннуклеотида (НАДН) и никотинамидадениннуклеотидфосфата (НАДФН) инициирует перекисное окисление липидов, обуславливая продукцию активных форм кислорода в кардиомиоцитах [11]. Следовательно, применение в нашем эксперименте поляризационной микроскопии позволило установить, что при моделировании ПТСР в миокарде молодых крыс обеих подгрупп и старых неустойчивых к стрессу животных возникает состояние ишемии, а в некоторых случаях и нарушение тканевого и клеточного дыхания, т.е., гипоксия. Экстраполируя полученные результаты на человека, можно сделать вывод, что ишемическая болезнь, возникшая в результате стрессирования в молодом возрасте, может прогрессировать и вызывать сердечную недостаточность, а также другие заболевания сердечно-сосудистой системы, снижающие трудоспособность и приводящие к инвалидности. Еще более опасно проявление ишемии миокарда в старческом возрасте.

Взаимосвязь между заболеванием и поведением человека и животных всегда интересовала философов, врачей и исследователей. К настоящему времени установлена тесная взаимосвязь между ишемической болезнью сердца и психическими заболеваниями. Причем связь двусторонняя, имеются свидетельства того, что одно заболевание может провоцировать другое. Существует достаточное количество проспективных эпидемиологических данных, доказывающих, что люди с тяжелыми психическими заболеваниями, вклю-

чая шизофрению, депрессивные и тревожные расстройства, а также ПТСР, характеризуются повышенным риском развития ишемической болезни сердца по сравнению с контрольной группой. С другой стороны, исследования также показывают, что психические симптомы указанных заболеваний часто встречаются у пациентов с ишемической болезнью сердца [12]. Несомненно, психические заболевания и сердечно-сосудистые заболевания имеют общую этиологию: биологические, поведенческие, психологические и генетические механизмы. Вместе с тем один фактор риска может увеличить риск развития нескольких других заболеваний.

В нашем эксперименте низкоустойчивые к стрессу крысы характеризовались выраженными признаками тревожности и большими значениями концентрации неэтерифицированных жирных кислот в крови, чем высокоустойчивые животные обеих возрастных групп. Несмотря на то что у лабораторных грызунов не развивается атеросклероз, у этих групп крыс в миокарде были обнаружены зоны аутофлюоресценции, свидетельствующие о состоянии ишемии и/или гипоксии. Следовательно, предикторами развития нарушений в сердце может быть повышение тревожности, сочетающееся с повышением концентрации неэтерифицированных жирных кислот в крови. В последние годы появляется все больше данных о взаимосвязи повышенных концентраций изучаемых нами жирных кислот с сердечно-сосудистыми заболеваниями и их факторами риска [13, 14]. Однако до сих пор до конца не ясно, что является причиной повышения концентрации указанных жирных кислот. Тем не менее нельзя исключать тот факт, что фармакологические агенты, способные изменять центральный аппарат, управляющий реакцией на стресс, могут быть полезны при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, впервые при моделировании ПТСР у крыс Вистар непосредственно в кардиомиоцитах обнаружено резкое снижение содержания основного энергетического депо — гликогена, выявлены признаки возникновения зон ишемии и гипоксии в миокарде. Установлены механизмы, индуцирующие эти процессы: нарушение метаболизма, синтеза, транспорта и доминирования основных форм энергии — глюкозы и липидов, регистрируемых в крови; судя по данным поляризационной микроскопии, в кардиомиоцитах наблюдаются накопление НАДН и НАДФН и изменение их редокс-состояния, что инициирует процессы перекисного окисления липидов и, соответственно, избыточную продукцию активных форм кислорода. Приоритетными являются сведения о том, что все эти патогенетические механизмы максимально выражены у неустойчивых к стрессу животных молодого и старого возраста. Сведения о высокой чувствительности к услови-

ям эксперимента индекса Castelli и отношения значений уровня глюкозы к значениям уровня триглицеридов могут быть полезны для анализа эффектов и масштабности воздействия изучаемых факторов. После дополнительных исследований уровень гликогена в кардиомиоцитах может быть прогностическим признаком, на который следует ориентироваться для проведения профилактических и лечебных мероприятий.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках базовой части Государственного задания ФГБНУ “НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына”, а также при финансовой поддержке Фонда перспективных научных исследований ФГБОУ высшего образования “Челябинский государственный университет”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Osório C., Probert T., Jones E., et al.* Adapting to Stress: Understanding the Neurobiology of Resilience // *Behav Med.* 2017. V. 43. № 4. P. 307–322.
2. *Somvanshi P.R., Mellon S.H., Flory J.D., et al.* Mechanistic inferences on metabolic dysfunction in posttraumatic stress disorder from an integrated model and multiomic analysis: role of glucocorticoid receptor sensitivity // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019. V. 317. № 5. E879–E898.
3. *Cohen H., Tianmin L., Kozlovsky N., et al.* The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of posttraumatic stress disorder // *Neuropsychopharmacol.* 2011. V. 37. № 2. P. 350–363.
4. *Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S.* Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge // *Clin Chem.* 1972. V. 18. № 6. P. 499–502.
5. *Климов А.Н.* Превентивная кардиология М.: Медицина; 1977. 271 с.
6. *Castelli W.P., Abbott R.D., McNamara P.M.* Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease // *Circulation.* 1983. V. 67. № 4. P. 730–734.
7. *Manukhina E.B., Tseilikman V.E., Komelkova M.V., et al.* Cardiac injury in rats with experimental posttraumatic stress disorder and mechanisms of its limitation in experimental posttraumatic stress disorder-resistant rats // *J Appl Physiol* (1985). 2021. V. 130. № 3. P. 759–771.
8. *Won B.Y., Park S.G., Lee S.-H., et al.* Characteristics of metabolic factors related to arterial stiffness in young and old adults // *Clin Exp Hypertens.* 2020. V. 42. № 3. P. 225–232.
9. *Kondashevskaya M.V.* Experimental Evaluation of the Effects of Low-Dose Heparin on the Behavior and

- Morphofunctional Status of the Liver in Wistar Rats with Posttraumatic Stress Disorders // *Bull Exp Biol Med*. 2018. V. 164. № 4. P. 488–492.
10. *Chance B., Cohen P., Jobsis F., et al.* Intracellular Oxidation-Reduction States in vivo // *Science*. 1962. V. 137. № 3529. P. 499–508.
 11. *Papayan G., Petrishchev N., Galagudza M.* Autofluorescence spectroscopy for NADH and flavoproteins redox state monitoring in the isolated rat heart subjected to ischemia-reperfusion // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014. V. 11. № 3. P. 400–408.
 12. *De Hert M., Detraux J., Vancampfort D.* The intriguing relationship between coronary heart disease and mental disorders // *Dialogues Clin Neurosci*. 2018. V. 20. № 1. P. 31–40.
 13. *Gharipour M., Sadeghi M., Nezafati P., et al.* Cardiovascular Disease Risk Assessment: Triglyceride/High-Density Lipoprotein versus Metabolic Syndrome Criteria // *J Res Health Sci*. 2019. V. 19. № 2. P. e00442.
 14. *Иванова А.Ю., Рысенкова Е.Ю., Афанасьев М.А., Чумаченко П.В., Попов В.С., Постнов А.Ю., Медведева Н.А., Медведев О.С.* Изменения морфофункциональных параметров сердечно-сосудистой системы на фоне рациона питания с повышенной калорийностью у спонтанно гипертензивных крыс // *Клин. эксп. морфология*. 2021. Т. 10. № 1. С. 50–57.

RISK FACTORS AND PATHOGENETIC MECHANISMS OF CARDIOVASCULAR DISEASES IN POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER MODEL IN WISTAR RATS DEPENDING ON STRESS RESISTANCE AND AGE

**M. V. Kondashevskaya^{a,#}, V. E. Tseilikman^b, M. V. Komelkova^{b,c}, P. N. Popkov^d,
M. S. Lapshin^b, P. O. Platkovskii^b, O. B. Tseilikman^{b,e}, S. A. Fedorov^b,
M. V. Cheresheva^c, and Academician of the RAS V. A. Chereshev^c**

^a *A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation*

^b *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “South Ural State University (national research university)”, Chelyabinsk, Russian Federation*

^c *Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

^d *South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation*

^e *Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

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

The article deals with an open issue – studying the pathogenetic mechanisms of posttraumatic stress disorder (PTSD), the disease that, because of the coronavirus pandemic, is linked to psychological stress. Amongst the crucial research interests of experimental and clinical medicine, stands the search for molecular mechanisms determining the development of the disease in certain individuals and of stress resistance in the others. Authors have obtained priority data suggesting that in PTSR modeling, myocardial dysfunction in stress sensitive Wistar rats is caused by the disturbance in synthesis, metabolism and, most significantly, in switch between the two transport forms of energy – glucose and lipids. Histochemistry and polarization microscopy determined energetic deficit in cardiomyocytes and signs of emerging ischemic and hypoxic areas in myocardium, caused with NADH and NADPH accumulation initiating an excessive production of reactive oxygen species.

Keywords: Wistar rats, posttraumatic stress disorder, stress resistance, stress sensitivity, transport forms of energy, myocardium

УДК 591.111.1: 597.95: 597.851

ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭКТОТЕРМНЫХ АМФИБИОНТОВ ФАУНЫ СРЕДНЕГО УРАЛА: СИБИРСКОГО УГЛОЗУБА (*SALAMANDRELLA KEYSERLINGII* DYBOVSKY, 1870, CAUDATA) И ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* PALLAS, 1771, ANURA)

© 2022 г. Л. А. Ковальчук^{1,*}, Л. В. Черная¹, В. А. Мищенко¹,
Д. Л. Берзин¹, академик РАН В. Н. Большаков¹

Поступило 03.03.2022 г.

После доработки 09.04.2022 г.

Принято к публикации 11.04.2022 г.

Впервые представлены результаты сравнительного анализа гематологических параметров экто-термных амфибионтов фауны Среднего Урала – сибирского углозуба (*S. keyserlingii*) и озерной лягушки (*P. ridibundus*). Показана видовая специфика иммунной защиты изученных видов по содержанию гранулоцитов и агранулоцитов ($p < 0.001$). Высокий лимфоцитарный профиль (73.3–76.1%) теплоустойчивой озерной лягушки обеспечивает активацию механизмов приобретенного адаптивного иммунитета. У сибирских углозубов, адаптированных к условиям низко отрицательных температур, присутствует набор неспецифических лейкоцитов (39.3–44.4%). В сравнении с озерными лягушками сибирские углозубы характеризуются более высоким развитием врожденного иммунитета.

Ключевые слова: сибирский углозуб, озерная лягушка, лимфоциты

DOI: 10.31857/S2686738922040096

Сокращающаяся численность популяций и видового разнообразия земноводных нарушает устойчивость сообществ водных и наземных экосистем в различных регионах планеты [1–3]. На территории горного Урала в его естественных и антропогенных ландшафтах обитают экологически контрастные по температурной толерантности виды амфибий из отряда Anura – озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771) и из отряда Caudata – сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii* Dybovsky, 1870) [4]. При исследовании механизмов гомеостаза сибирского углозуба и озерной лягушки нами показана видовая специфика термостабильного аминокислотного спектра плазмы крови изученных амфибий, поддерживающая их выживание и эврибионтность в широком температурном диапазоне [5]. Также отмечено присутствие в крови свободных аминокислот, обладающих иммуномодулирующими свойствами и участвующих в регуляции гемопоэза [5]. Известно, что в эволюционном аспекте роль системы крови позвоночных определяется

как решающая при формировании резистентности организма к воздействию биотических и абиотических факторов среды (температура, гипоксия, токсичные химические вещества, паразитарные инфекции, стресс) [6–8]. Помимо этого, система крови у представителей герпетофауны достаточно высоко организована, а состав и морфология лимфоидной системы не отличаются от данных имеющихся научных источников по исследованию позвоночных [9–14]. Это позволяет считать, что адаптивная стратегия длительного пребывания сибирского углозуба (СУ) в условиях низко отрицательных температур (–30°C...–45°C) и толерантность озерной лягушки (ОЛ) к экстремально положительным температурам (+28°C...+40°C) несомненно обуславливает выживание амфибионтов [5, 15, 16]. Однако основная информация о механизмах иммунной защиты природных популяций хвостатых и бесхвостых амфибий весьма ограничена, а реакции адаптивного иммунитета и участие неспецифических иммунных ответов в регуляции физиологических процессов практически не исследованы [6].

Цель работы – сравнительный анализ иммуногематологических параметров периферической крови эктотермных амфибионтов природных популяций фауны Среднего Урала: сибир-

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

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

ского углозуба (*S. keyserlingii*) и озерной лягушки (*P. ridibundus*).

Экспериментальные группы животных представлены половозрелыми самцами *S. keyserlingii* ($n = 20$) и *P. ridibundus* ($n = 20$), отловленными на территории Свердловской области ($56^{\circ}42'$ с.ш. $61^{\circ}20'$ в.д.) в весенний (первая декада мая) и летний (последняя декада июля) сезоны 2019–2020 гг. Отлов амфибионтов в нерестовых водоемах проводился с помощью водного сачка; сбор особей СУ в летний период осуществляли вручную в наземных укрытиях. Животных без признаков заболеваний доставляли в лабораторию в отдельных контейнерах с влажным мхом в день отлова. Сибирский углозуб *S. keyserlingii* включен в Красную Книгу Среднего Урала [17]. Статус – III категория. Редкий, малочисленный вид на периферии ареала. Встречается повсеместно, но спорадически. Экспериментальные особи СУ отловлены на затененных участках прибрежной части Калиновского пруда, расположенного в особо охраняемой лесопарковой зоне городской агломерации. Температура воды в весенний период составляла $+11^{\circ}\text{C}$, в летний $+17^{\circ}\text{C}$ при среднесуточной температуре воздуха $+15^{\circ}\text{C}$ и $+21^{\circ}\text{C}$ соответственно. Взрослые особи СУ всю жизнь проводят на суше в прибрежной полосе нерестового водоема, за исключением короткого периода размножения. Длительного пребывания на солнце не переносят и при температуре в тени около $+27^{\circ}\text{C}$ погибают. Следует отметить, что большинство видов амфибий не способны адаптироваться к обитанию в теплых водоемах, тем не менее исследователи отмечают обитание озерной лягушки (инвазивный вид на Урале) в термальных водоемах, где температура воды достигает и до $+30^{\circ}\text{C}$ [4]. Опытные особи ОЛ отловлены в неглубоких заводях р. Тагил, где температура воды весной составляла в среднем $+21^{\circ}\text{C}$, а летом $+27^{\circ}\text{C}$ и выше, при среднесуточной температуре воздуха $+14^{\circ}\text{C}$ и $+19^{\circ}\text{C}$ соответственно. Зимой температура воды исследуемого водотока не опускается ниже $+10^{\circ}\text{C} \dots +12^{\circ}\text{C}$, и обитающие в нем ОЛ характеризуются отсутствием зимней спячки. Показатели периферической крови определяли с помощью гематологического анализатора “BC-5800” (Mindray, Китай). Лейкоцитарную формулу рассчитывали на 100 лейкоцитов в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. На основании лейкоцитарной формулы определяли интегральный лейкоцитарный индекс (ИСЛ – соотношение гранулоцитов и агранулоцитов в отн. ед.), позволяющий оценить модуляцию эффекторных механизмов иммунной системы и степень напряженности компенсаторных процессов в организме. Результаты обработаны с использованием пакета лицензионных прикладных программ “Statistica v. 10.0”. Метод главных компонент (РСА) реали-

зован посредством статистической среды R (R 3.1.2, пакеты “Vegan и “Ade4”) [18].

Исследования периферической крови амфибионтов показали статистически значимое повышенное содержание гемоглобина в 1.5 раза у СУ (59.8 ± 3.3 г/л) в сравнении с ОЛ (40.2 ± 2.5 г/л) ($p = 0.04$). Показатели содержания гемоглобина соответствуют значениям, приведенным в работах отечественных исследователей [10, 14, 19]. Превышение содержания тромбоцитов в 3.5 раза (41.7 ± 5.8 Г/л) ($p = 0.01$) и двукратное повышение тромбоцита (PCT = 0.02%) связаны с возросшей долей объема цельной крови, занимаемой тромбоцитами, участвующими в иммунных реакциях у ОЛ в сравнении с СУ. У сибирского углозуба в весенний и летний периоды отмечено высокое содержание лейкоцитов (77.0 ± 7.5 Г/л), что в 2.4 раза больше, чем у ОЛ ($p = 0.001$). Лейкоцитарный состав крови ОЛ и СУ, как и у всех позвоночных, представлен двумя группами клеток: гранулоцитами (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы), определяющими реакции врожденного иммунитета, и агранулоцитами (моноциты, лимфоциты), ответственными за реакции адаптивного иммунного ответа [6, 20]. В весенний и летний периоды лейкоцитарная формула периферической крови исследуемых амфибий имеет лимфоидный профиль: у ОЛ (69.1–69.8%) и у СУ (52.4–56.7%) (табл. 1). Выявлены видовые различия по количественному содержанию лимфоцитов, гранулоцитов и агранулоцитов, отражающих взаимосвязь эффекторных механизмов иммунной системы генетически детерминированных видов амфибий ($p < 0.001$) (табл. 1).

Периферическая кровь исследованных видов характеризуется преобладанием агранулоцитов, обеспечивающих иммунный надзор и избирательную реактивность организма в весенний и летний сезоны: у ОЛ – 73.3–76.1% и у СУ – 55.7–60.3% ($p < 0.001$). Лимфоцитарно-гранулоцитарный состав периферической крови амфибий характеризуется невысокой долей гранулоцитов у ОЛ (24.0–26.7%) в сравнении с СУ (39.3–44.4%) ($p < 0.001$). В весенний и летний периоды в периферической крови СУ доля гранулоцитов в 1.7 раза выше, чем у ОЛ ($p < 0.001$), а доля агранулоцитов на 30% выше у ОЛ (табл. 1). Повышенный уровень нейтрофилов ($p < 0.001$) периферической крови СУ обеспечивает неспецифическую защиту организма как от токсических воздействий, так и от патогенных инфекций. Отмечена также разнонаправленность сезонной динамики палочкоядерных нейтрофилов в крови ОЛ и СУ ($p < 0.001$) (табл. 1). У летних особей ОЛ снижено содержание сегментоядерных нейтрофилов в 2.7 раза и у СУ в 3.3 раза.

Активация эозинофильного гранулоцитопоэза в крови самцов ОЛ в 2.6 раза ($p < 0.001$) и у СУ

Таблица 1. Параметры лейкоцитарной формулы самцов озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*) и сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*). Среднее арифметическое (X_{Mboot}), ошибка среднего (SE_{boot}) и доверительный интервал ([95% CI_{boot}]) бутстреп-распределения

Показатели, %	Вид	I. Весна		II. Лето		Tukey's test (<i>p</i> -value)	
		ОЛ (<i>n</i> = 8) СУ (<i>n</i> = 11)	ОЛ (<i>n</i> = 8) СУ (<i>n</i> = 11)	ОЛ (<i>n</i> = 12) СУ (<i>n</i> = 9)	ОЛ (<i>n</i> = 12) СУ (<i>n</i> = 9)		
Нейтрофилы	ОЛ	24.1 ± 1.4 [21.1–26.8]	17.1 ± 0.5* [16.2–18.0]	I–II (< 0.001)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	40.6 ± 1.0@ [38.8–42.6]	33.4 ± 0.6*@ [32.3–34.4]			I–II (< 0.001)	
– юные	ОЛ	3.3 ± 0.3 [2.6–4.0]	5.8 ± 0.4* [5.2–6.5]	I–II (< 0.001)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	6.2 ± 0.3@ [5.7–6.7]	9.3 ± 0.4*@ [8.6–10.0]			I–II (< 0.001)	
– палочкоядерные	ОЛ	9.2 ± 0.7 [7.9–10.5]	6.9 ± 0.6* [5.8–8.0]	I–II (0.05)	Вид I: 0.28 II: < 0.001		
	СУ	10.1 ± 0.4 [9.3–10.9]	17.1 ± 0.3*@ [16.4–17.8]			I–II (< 0.001)	
– сегментоядерные	ОЛ	11.5 ± 1.0 [9.7–13.7]	4.2 ± 0.2* [3.7–4.6]	I–II (< 0.001)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	23.8 ± 0.6@ [22.7–24.9]	7.1 ± 0.5*@ [6.1–8.0]			I–II (< 0.001)	
Эозинофилы	ОЛ	2.7 ± 0.3 [2.1–3.2]	6.9 ± 0.5* [5.9–7.9]	I–II (< 0.001)	Вид I: 0.05 II: 0.10		
	СУ	3.8 ± 0.2@ [3.4–4.3]	5.9 ± 0.3* [5.4–6.3]			I–II (< 0.001)	
Моноциты	ОЛ	4.2 ± 0.6 [3.0–5.4]	6.3 ± 0.5* [5.4–7.3]	I–II (0.001)	Вид I: 0.15 II: < 0.001		
	СУ	3.3 ± 0.2 [2.9–3.7]	3.6 ± 0.2@ [3.3–3.9]			I–II (0.60)	
Лимфоциты	ОЛ	69.1 ± 0.9 [67.5–71.1]	69.8 ± 0.5 [68.8–70.8]	I–II (0.60)	Вид I: < 0.001 II: < 0.001		
	СУ	52.4 ± 1.0@ [50.4–54.4]	56.7 ± 0.8*@ [55.2–58.1]			I–II (0.001)	

* – статистически значимые сезонные различия: I и II ($p < 0.05$); @ – видовые различия ($p < 0.05$); ОЛ – озерная лягушка, СУ – сибирский углозуб.

Note: * – statistically significant seasonal differences: I and II ($p < 0.05$); @ – species differences ($p < 0.05$); LF – Lake frog, SS – Siberian salamander.

в 1.6 раза ($p < 0.001$) в летний период свидетельствует о единых механизмах, определяющих способность животных к избирательной адаптивной стратегии как по антимикробной, так и по проти-

вогельминтной иммунной защите [13, 14]. В периферической крови половозрелых самцов СУ в весенний и летний периоды отмечено значимое содержание участников клеточных воспалитель-

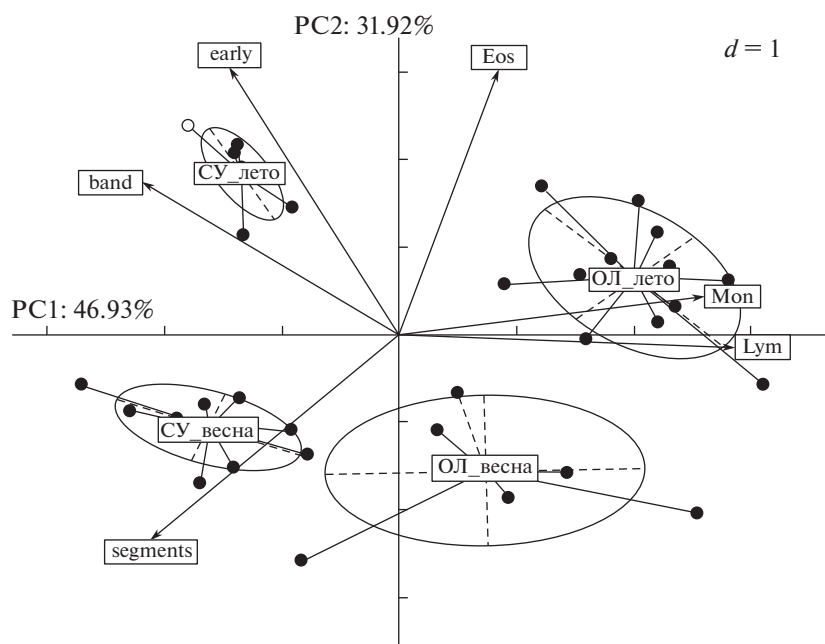


Рис. 1. Результаты компонентного анализа лейкограммы (%) сибирского углозуба (СУ) и озерной лягушки (ОЛ) в разные сезоны года. PC1, PC2 – оси главных компонент, % – процент дисперсии данных, объясненных главной компонентой; стрелки отражают корреляцию главных компонент с исходными показателями; эллипсы представляют собой 95% доверительные области.

ных реакций: базофильных лейкоцитов (0.08–0.09%) и их отсутствие в крови ОЛ. Межвидовые различия по содержанию моноцитов у исследуемых гидробионтов весной отсутствуют ($p = 0.15$) и наблюдаются в летний период ($p < 0.001$). Известно, что повышенная активация моноцитов, выполняющая фагоцитарную роль, продуцирует провоспалительные цитокины – эндогенные регуляторы гемопоэза и клеточно-опосредованного иммунного ответа [7, 11, 20].

По-видимому, в ответ на действие эндотоксинов среды обитания моноциты ОЛ (в отличие от СУ) в летний период усиливают выработку провоспалительных цитокинов, активируя систему естественного иммунитета ($p < 0.001$). Проведенный расчет *ИСЛ* подтвердил межвидовые различия в лейкоцитарном профиле исследованных животных. Высокий показатель *ИСЛ* (0.65–0.80) для СУ, по сравнению с *ИСЛ* (0.32–0.36) для ОЛ подтверждает более выраженную реактивность системы врожденного иммунитета, обеспечивающей неспецифическую срочную защиту организма от патогенных антигенов среды обитания ($p < 0.001$). Наряду с единицами закономерностями, выявленными в путях поддержания гомеостаза у двух видов амфибий: озерной лягушки и сибирского углозуба, показана и определенная стратегия разнонаправленности в механизмах аварийного регулирования иммунитета.

Использование метода главных компонент (РСА) позволило визуализировать видовую и се-

зонную специфику лейкоцитарного состава крови СУ и ОЛ, подтверждая результаты представленного выше статистического анализа. Показано, что 46.93% общей дисперсии параметров крови приходится на первую главную компоненту (PC1), 31.92% – на вторую главную компоненту (PC2) (рис. 1). Первая (PC1) и вторая (PC2) главные переменные обуславливают значимые различия амфибионтов по основным параметрам лейкоцитарной крови. Наибольший вклад в межвидовую изменчивость показателей крови по PC1 вносят лимфоциты (30.43%), моноциты (25.01%), палочкоядерные нейтрофилы (17.68%), сегментоядерные нейтрофилы (16.52%). Их коэффициенты корреляции с PC1 составили соответственно: 0.93, 0.84, –0.71, –0.68 ($p < 0.001$). Первая главная компонента по этим переменным четко выделяет в самостоятельные группы как особей резистентного вида к холоду (СУ), так и теплоустойчивого вида (ОЛ) (рис. 1). Со второй главной компонентой PC2 высоко коррелируют эозинофилы (0.80), юные нейтрофилы (0.81), сегментоядерные нейтрофилы (–0.62). Вклад этих показателей в сезонную изменчивость лейкоцитарной формулы изучаемых видов амфибий составил 33.67, 34.18 и 20.29%, соответственно, что также подтверждает неоднородность особей исследованных двух экологически контрастных видов амфибий по данным показателям. Из рисунка видно, что все представленные данные обособлены в четыре самостоятельные группы, причем их наибольшая

пространственная дифференциация обусловлена альтерацией лейкоцитарного состава крови в зависимости от сезона.

Таким образом, результаты проведенных исследований впервые позволили оценить видовую специфику эффекторных механизмов иммунной системы в регуляции физиологических процессов амфибионтов: озерной лягушки и сибирского углозуба, что обеспечивает выживание и эврипогодность исследованных видов в широком температурном диапазоне естественных и антропогенных ландшафтов Среднего Урала. Знание о наследственно обусловленных иммунологических параметрах гомеостаза видов, помимо несомненного теоретического интереса, имеют и прикладное значение при разработке природоохранных мероприятий в условиях быстрых преобразований среды обитания.

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. *Strayer D., Dudgeon D.* Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges // *Science*. 2010. V. 29. № 1. P. 344–358.
2. Global amphibian assessment. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 2008. Cambridge, UK. (Available from: <http://www.globalamphibians.org>).
3. *Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., et al.* Status and trend of amphibian decline and extinction worldwide // *Science*. 2004. V. 306. P. 1783–1786.
4. *Большаков В.Н., Вершинин В.Л.* Амфибии и рептилии Среднего Урала. Екатеринбург; 2005.
5. *Ковальчук Л.А., Черная Л.В., Мищенко В.А., и др.* Аминокислотный спектр плазмы крови эндемичного и инвазивного видов земноводных фауны Урала // Доклады Российской академии наук. Научки о жизни. 2021. Т. 500. № 1. С. 478–482.
6. *Хаитов Р.М.* Иммунология: Структура и функции иммунной системы. М.: ГЭОТАР – Медиа. 2013.
7. *Davis F.R., Maney D.L., Maers J.C.* The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists // *Functional Ecology*. 2008. V. 22. P. 760–772.
8. *Ковальчук Л.А., Мищенко В.А., Черная Л.В., и др.* Особенности иммуногематологических параметров перелетного (*Vespertilio murinus* Linnaeus, 1758) и оседлого (*Myotis dasycneme* Boie, 1825) видов рукокрылых фауны Урала // Доклады РАН. Научки о жизни. 2021. Т. 501. № 6. С. 49–52.
9. *Fournier M., Robert J., Salo H.M., et al.* Immunotoxicology of Amphibians // *Applied Herpetology*. 2005. V. 2. P. 297–309.
10. *Силс Е.А.* Сравнительный анализ гематологических показателей остромордой (*Rana arvalis*, Nilsson, 1842) и озерной (*Rana ridibunda*, Pallas, 1771) лягушек городских популяций // Вестник ОГУ. 2008. № 10 (92). С. 230–235.
11. *Zimmerman L.M., Vogel L.A., Bowden R.M.* Understanding the vertebrate immune system: Insights from the reptilian perspective // *Journal Experimental Biology*. 2010. V. 213. P. 661–671.
12. *Arikan H., Cicek K.* Hematology of amphibians and reptiles: a review // *North-West. J. Zool*. 2014. V. 10. № 1. P. 190–209.
13. *Романова Е.Б., Соломайкин Е.И., Бакиев А.Г. и др.* Лейкоцитарный состав крови *Elaphe diene* (Serpentes: Colubridae) заповедника “Оренбургский” (Россия) // *Nature Cons. Res. Заповедная наука*. 2018. № 3. С. 28–35.
14. *Романова Е.Б., Шаповалова К.В., Рябинина Е.С.* Лейкоцитарный состав крови и микроядра в эритроцитах амфибий загрязненных водных объектов Нижегородской области // *Принципы экологии*. 2018. № 2. С. 125–139.
15. *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.
16. *Ляпков С.М.* Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) в термальных водоемах Камчатки // Зоол. журн. 2014. Т. 93. № 12. С. 1427–1432.
17. Красная книга Среднего Урала. Екатеринбург; Изд-во Урал. Ун-та. 1996.
18. *Chessel D., Dufour A.B., Thioulouse J.* The ade 4 package-I: One-table methods // *R News*. 2004. № 4. P. 5–10.
19. *Вершинин В.Л., Вершинина С.Д.* Сравнительный анализ содержания гемоглобина у четырех видов бесхвостых амфибий Уральской горной страны // Доклады РАН. 2013. № 4. С. 488–491.
20. *Coico R., Sunshine G., Benjamini E.* Immunology. A Short Course. Hoboken. NJ: Wiley-Liss Publications. 2003.

IMMUNOHEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ECTOTHERMAL AMPHIBIANS OF THE FAUNA OF THE MIDDLE URALS: SIBERIAN SALAMANDER (*HYNOBIUS KEYSERLINGII* DYBOVSKY, 1870, CAUDATA) AND LAKE FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* PALLAS, 1771, ANURA)

**L. A. Kovalchuk^{a,#}, L. V. Chernaya^a, V. A. Mishchenko^a,
D. L. Berzin^a, and Academician of the RAS V. N. Bolshakov^a**

^a *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*

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

The results of a comparative analysis of hematological parameters of amphibians of the Middle Ural fauna: – Siberian salamander (*S. keyserlingii*) and Lake frog (*P. ridibundus*) are presented for the first time. The species specificity of the immune protection of amphibians by the granulocytes and agranulocytes content is shown ($p < 0.001$). The high lymphocytic profile (73.3–76.1%) of the thermophilous lake frog provides activation of the mechanisms of acquired adaptive immunity. Siberian salamanders adapted to conditions of low negative temperatures have a set of nonspecific leukocytes (39.3–44.4%). In comparison with Lake frogs, Siberian salamanders are characterized by a higher development of innate immunity.

Keywords: Siberian salamander, Lake frog, lymphocytes

УДК 591.431.4-932.343(470.5) 624/627

НАХОДКА ЗУБОВ АРХАИЧНОЙ ПОЛЕВКИ *LASIOPodomys* (*STENOCRANIUS*) *GREGALOIDES* (HINTON, 1923) (MAMMALIA, RODENTIA, CRICETIDAE) В ПОЗДНЕМ ПЛЕЙСТОЦЕНЕ ЮЖНОГО УРАЛА

© 2022 г. Т. В. Фадеева¹, П. А. Косинцев^{2,*}, Д. О. Гимранов², А. Г. Яковлев³

Представлено академиком РАН В.Н. Большаковым

Поступило 26.02.2022 г.

После доработки 13.04.2022 г.

Принято к публикации 15.04.2022 г.

Из позднеплейстоценовых отложений (радиоуглеродные даты по костям грызунов: $17\,100 \pm 50$ IGAN_{AMS}-9117; $13\,255 \pm 60$ IGAN_{AMS}-9116) пещеры Иманай (Южный Урал, 53°02' N, 56°26' E) изучено 1250 первых нижнекоренных зубов (m1) полевок трибы Arvicolini. Обнаружено 24 зуба полевок подрода *Stenocranius* с широким слиянием первой пары треугольников Т4-Т5 (слияние “*Pitymys*-Rhombus”) в основании антерокидного отдела. Такое строение характерно для первых нижнекоренных зубов *L. (Stenocranius) gregaloides* (Hinton, 1923) из фаун второй половины раннего плейстоцена и первой половины среднего плейстоцена. Ранее в местонахождениях позднего плейстоцена и голоцена Европы и Урала зубы с такой морфологией не были обнаружены.

Ключевые слова: *Lasiopodomys (Stenocranius) gregaloides*, Arvicolini, Rodentia, поздний плейстоцен, Урал, пещера Иманай

DOI: 10.31857/S2686738922040047

В ряде филетических линий группы родов полевок (Arvicolini) прослежены хорошо выраженные, хронологически последовательные, изменения формы жевательной поверхности m1 [1]. Они входят в группу важнейших биостратиграфических маркеров, на основе которых построена биохронология плейстоцена. К ним относится линия *Lasiopodomys (Stenocranius) hintoni* (Kretzoi, 1941) – *L. (S.) gregaloides* (Hinton, 1923) – *L. (S.) gregalis* (Pallas, 1779). В Европе первая форма появляется в конце раннего плейстоцена (около 1 млн лет назад). В начале среднего плейстоцена (около 0.75 млн лет назад) ее сменяет вторая форма и в середине среднего плейстоцена (около 0.6 млн лет назад) появляется современный вид *L. (S.) gregalis* [2]. Таким образом, продолжительность существования этой линии полевок составляет

около 1 млн лет. Виды имели широкое географическое распространение. Ареал *L. (S.) hintoni* и *L. (S.) gregaloides* занимал Европу и Западную Сибирь, а ареал *S. gregalis* в плейстоцене охватывал большую часть Европы и Северную Азию до Забайкалья [3, 4]. Такое широкое пространственно-временное распространение проявлялось в хорошо выраженной хронологической и географической изменчивости размеров и морфотипов зубов [2, 3, 5]. Но не для всех регионов и хронологических периодов эта изменчивость изучена. В данной работе приведено описание новых находок представителей этой филетической линии из пещеры Иманай на Южном Урале.

Проведено исследование рыхлых отложений пещеры Иманай (Мелеузовский район, Республики Башкортостан, Россия; 53°02' N, 56°26' E). Отложения состоят из 2 слоев: слой 1, мощностью 0.6 м – суглинок сероватый с известняковым щебнем, есть единичные изделия из кремня; слой 2, мощностью 0.6 м – суглинок бурый с единичными валунами и глыбами известняка [6]. Отложения раскапывались условными горизонтами по 0.1 м. Вместе с костями крупных млекопитающих [7] было получено 15430 зубов и челюстей мелких млекопитающих из отрядов Euliphotyphla, Chiroptera, Lagomorpha and Rodentia. Коллекция хранится в музее Института экологии УрО РАН, № 2284.

¹ Горный институт, Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

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

³ Институт геологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

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

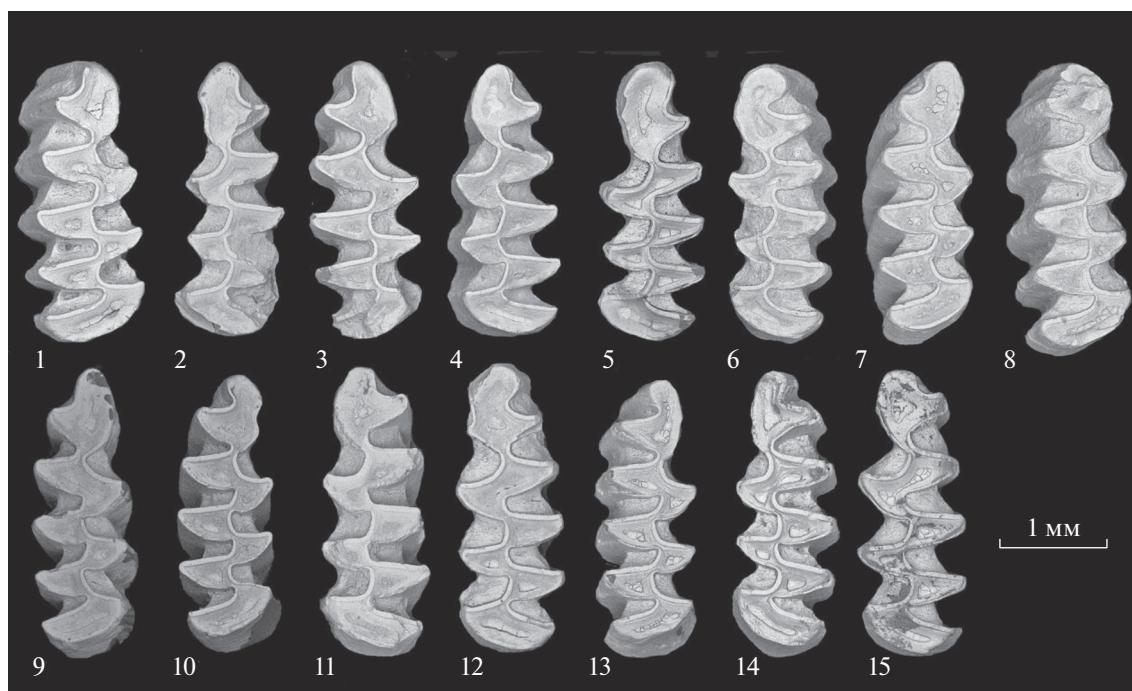


Рис. 1. Зубы полевок из отложений квадрата Г4 пещеры Иманай. *Lasiopodomys (Stenocranius) gregaloides* (Hinton, 1923): 1, 2 – глубина 40–50 см; 3–5 – 50–60 см; 6–8 – 70–80 см; 9–10 – 80–90 см; 11 – 90–100 см; 12–14 – 100–110 см; 15 – 110–120 см.

По коллагену костей мелких млекопитающих получено две радиоуглеродные даты: $17\,100 \pm 50$ $IGAN_{AMS}-9117$ (глубина 100–110 см) и $13\,255 \pm 60$ $IGAN_{AMS}-9116$ (глубина 50–60 см). Приведены не

калиброванные радиоуглеродные даты. Накопление остатков мелких млекопитающих происходило в середине МИС 2, в позднеледниковье. Все остатки мелких млекопитающих имеют одинаково-

Таблица 1. Размеры (мм) и пропорции (%%) первого нижнего коренного зуба (m1) *Lasiopodomys (Stenocranius) gregaloides*

Признаки	Местонахождения*				
	Вяткино, слой 7 (n = 25)**	Большевик-2 (n = 9)	Kozi Grzbiet, слой a (n = 15); слои b,c (n = 17)	West Runton (n = 35)	Иманай (n = 15)
L (длина m1)	2.3–2.54–2.75	2.45–2.54–2.75	слой (a) 2.36–2.61–2.81 слои (b,c) 2.50–2.73–2.92	2.19–2.40–2.77	2.30–2.48–2.64
A (длина антероконидного отдела)	1.1–1.3–1.45	1.2–1.29–1.45	–	–	1.24–1.32–1.40
C (ширина слияния треугольников антероконида)	–	0.12–0.17–0.25	–	–	0.09–0.13–0.18
W (косая ширина треугольников антероконида)	–	0.8–0.89–0.95	–	–	0.74–0.83–0.93
A/L (×100)	–	48.0–51.4–57.3	–	48.50–52.56–56.60	50.38–53.22–56.28
C/W (×100)	–	15.0–19.2–27.8	–	–	10.23–15.83–21.69

* – Вяткино по: [11], Большевик-2 по: [3], Kozi Grzbiet по: [8], West Runton по: [10], Иманай: данная статья.

** – Минимальное значение – Среднее значение – Максимальное значение.

вую степень фоссилизации. Терминология, промеры и морфотипы зубов серых полевок даны по [8, 9].

Фауна мелких млекопитающих из пещеры Иманай включает: крота (*Talpa* sp.), белозубку (*Crocidura* sp.), обыкновенную бурозубку (*Sorex araneus*), тундряную бурозубку (*S. tundrensis*), равнотубую бурозубку (*S. isodon*), бурого ушана (*Plecotus auritus*), северного кожанка (*Eptesicus nilssonii*), пищуху (*Ochotona* sp.), суслика (*Spermophilus* sp.), степную мышовку (*Sicista subtilis*), большого тушканчика (*Allactaga major*), тарбаганчика (*Pygeretmus pumilio*), хомяка обыкновенного (*Cricetus cricetus*), хомячка Эверсмманна (*Allocricetulus evermanni*), серого хомячка (*Cricetulus migratorius*), обыкновенную слепушонку (*Ellobius talpinus*), красносерую полевку (*Craxomys rufocanus*), рыжую полевку (*Myodes glareolus*), красную полевку (*M. rutilus*), желтую пеструшку (*Eolagurus luteus*), степную пеструшку (*Lagurus lagurus*), водяную полевку (*Arvicola amphibius*), узкочерепную полевку (*Lasiopodomys gregalis*), полевку-экономку (*Alexandromys oeconomus*), обыкновенную полевку (*Microtus arvalis*), темную полевку (*Microtus agrestis*), лесную мышь (*Sylvaemus* sp.). В составе фауны резко доминируют узкочерепная полевка и степная пеструшка. В целом состав и структура этой фауны аналогичны позднеледниковым фаунам из отложений других пещер Южного Урала [10].

Среди 1250 зубов m1 полевок трибы Arvicolini было обнаружено 5 целых (рис. 1) и 9 фрагментов цементных некорнезубых зубов m1 подрода *Stenocranius* с широким слиянием первой пары треугольников (T4–T5) (слияние “*Pitymys-Rhombus*”) в основании антероконидного отдела (табл. 1). Такое слияние треугольников специфично для *L. gregaloides* и отличает ее от *L. gregalis*. Эти зубы имеют значительные отложения наружного цемента. Эмаль заметно тоньше на выпуклых стенках петель, перерывы эмали обнаружены только на буккальной стороне головки передней непарной петли. Имеется входящий угол различной степени глубины на лингвальной стороне головки. Входящий угол на буккальной стороне головки развит слабо, либо отсутствует. Головка непарной петли отделена от антероконидных треугольников (T4–T5), которые слиты между собой. Форма антероконидного отдела изменчива и представлена тремя морфотипами, выделенными для *L. (S.) gregaloides* [9]: “*gregaloides*” (выпуклая буккальная сторона головки антероконидного отдела), “*gregalis*” (ровная буккальная сторона головки), “*gregaloides-arvalidens*” (буккальная сторона головки вогнута, образуя входящий угол). К морфотипу “*gregaloides*” отнесено 6 зубов (с выпуклой буккальной стороной головки антероконидного отдела), к морфотипу “*gregalis*” — 11 зубов и к морфотипу “*gregaloides-arvalidens*” — 7 зубов.

Полученные данные показывают, что в состав позднеплейстоценовой фауны грызунов из пещеры Иманай наряду с *L. (S.) gregalis* входила среднеплейстоценовая *L. (S.) gregaloides*. Последняя была широко распространена в Европе [2, 3, 9, 11], ее остатки найдены в Южном Зауралье [1], на Алтае [14]. В некоторых среднеплейстоценовых местонахождениях Восточной Европы она найдена вместе с *L. (S.) gregalis* [3, 5]. В европейских фаунах позднего плейстоцена и голоцена, в том числе с территории Урала, зубов m1 с широким слиянием антероконидных треугольников, характерных для *L. (S.) gregaloides*, не обнаружено [3, 5, 15]. Но зубы с морфотипом “*gregaloides*” найдены в позднеплейстоценовых выборках узкочерепных полевок Среднего и Южного Зауралья и в современных азиатских выборках этого вида [1].

Находка *L. (S.) gregaloides* в составе позднеплейстоценовой фауны из пещеры Иманай показывает географическую и хронологическую асинхронность преобразований морфологии зубов в филетической линии *Stenocranius hintoni* — *S. gregaloides* — *S. gregalis*. В некоторых регионах, преимущественно в восточной части ареала, сохранились архаичные формы *S. gregaloides*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-00041).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Большаков В.Н., Васильева И.А., Малеева А.Г.* // Морфотипическая изменчивость зубов полевок. М.: Наука, 1980.
2. *Markova A.K., Puzachenko A.Yu.* Middle Pleistocene small mammal faunas of Europe: Evolution, Biostratigraphy, Correlations // *Geography, Environment, Sustainability*. 2018. V. 11. № 3. P. 21–38.
3. *Рековец Л.И.* Мелкие млекопитающие антропогена юга Восточной Европы. // Киев: Наукова думка; 1994.
4. *Khenzykhenova F.I.* Paleoenvironments of Palaeolithic humans in the Baikal region // *Quaternary International*. 2008. V. 179. P. 53–57.
5. *Агаджанян А.К.* Мелкие млекопитающие плиоцен-плейстоцена Русской равнины. // М.: Наука; 2009. Тр. ПИН РАН. Т. 289.
6. *Гимранов Д.О., Косинцев П.А., Бачура О.П. и др.* Малый пещерный медведь (*Ursus ex gr. savini-rossicus*) как объект охоты древнего человека // *Вестник археологии, антропологии и этнографии*. 2021. № 2. С. 5–14.
7. *Gimranov D., Kosintsev P.* Quaternary large mammals from the Imanay Cave // *Quaternary International*. 2020. V. 546. P. 125–134.
8. *Meulen A.J. van der.* Middle Pleistocene smaller mammals from the Monte Peglia (Orivieto, Italy) with spe-

- cial reference to the phylogeny of *Microtus* (Arvicolidae, Rodentia) // Quaternaria. 1973. V. 17. P. 1–144.
9. *Nadachowski A.* Biharian voles (Arvicolidae, Rodentia, Mammalia) from Kozi Grzbiet (Central Poland) // *Acta zoologica cracoviensia*. 1985. V. 29. № 1. P. 13–27.
 10. *Danukalova G., Kosintsev P., Yakovlev A., et al.* Quaternary deposits and biostratigraphy in caves and grottoes located in the Southern Urals (Russia) // *Quaternary International*. 2020. V. 546. P. 84–124.
 11. *Maul L.C., Parfitt S.A.* Micromammals from the 1995 mammoth excavation at West Runton, Norfolk, UK: morphometric data, biostratigraphy and taxonomic reappraisal. // *Quaternary International*. 2010. V. 228. P. 91–115.
 12. *Зажигин В.С.* Грызуны позднего плиоцена и антропогена юга Западной Сибири. М.: Наука; 1980. Тр. ГИН АН СССР. Вып. 339.
 13. *Hinton M.A.* Diagnoses of species of *Pitymys* and *Microtus* occurring in the Upper Freshwater Bed of West Runton, Norfolk // *Ann. Mag. Natur. History*. 1923. V. 12. № 9. P. 541–542.
 14. *Serdyuk N.* Ancient voles (Arvicolinae, Cricetidae, Rodentia, Mammalia) from the Pleistocene of the Central Altai // *Paleontological Journal*. 2020. V. 44. № 3. P. 337–347.
 15. *Маркова А.К.* Плейстоценовые грызуны Русской равнины. М.: Наука; 1982.

THE FINDING OF MOLARS OF THE ARCHAIC VOLE *LASIOPODOMYS* (*STENOCRANIUS*) *GREGALOIDES* (HINTON, 1923) (MAMMALIA, RODENTIA, CRICETIDAE) IN THE LATE PLEISTOCENE OF THE SOUTHERN URALS

T. V. Fadeeva^a, P. A. Kosintsev^{b,#}, D. O. Gimranov^b, and A. G. Yakovlev^c

^a *Mining Institute, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

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

^c *Institute of Geology, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS V.N. Bolshakov

1250 first lower molars (m1) of the voles (Arvicolini) were studied from Late Pleistocene deposits (the radiocarbon dates from rodent bones: 17100 ± 50 IGAN_{AMS}-9117; 13255 ± 60 IGAN_{AMS}-9116) of the Imanay cave (South Urals, 53°02' N, 56°26' E). 24 m1 of voles of the subgenus *Stenocranius* with broadly connected triangles T4 and T5 (“*Pitymys*-Rhombus”) at the base of the anteroconid were found. This structure is characteristic of the first lower molars of *L. (Stenocranius) gregaloides* (Hinton, 1923) from faunas of the second half of the Early Pleistocene and the first half of the Middle Pleistocene. Molars with such morphology have not been found previously in the Late Pleistocene and Holocene locations of Europe and Urals.

Keywords: Lasiopodomys (Stenocranius) gregaloides, Arvicolini, Rodentia, Late Pleistocene, Ural, Imanay cave

УДК 631.4

СТРЕССЫ РАСТЕНИЙ И АЛЛЕЛОТОКСИЧНОСТЬ ПОЧВ

© 2022 г. Академик РАН Б. И. Сандухадзе¹, Г. Н. Федотов², Н. В. Давыдова¹, Р. З. Мамедов¹, В. А. Нардид¹, И. В. Горепекин², М. С. Крахмалёва¹, Д. И. Потапов², А. О. Казаченко¹, Е. В. Савинов¹, Т. А. Грачева^{2,*}

Поступило 15.02.2022 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принято к публикации 15.04.2022 г.

Известно, что стрессы при выращивании сельскохозяйственных растений снижают урожайность, однако определять величину и продолжительность стрессов по потере урожая достаточно сложно. Также хорошо известно, что возникновение стрессовых воздействий приводит к выделению растениями в почву, в которой они вегетируют, аллелотоксинов. В работе предложено использовать в качестве диагностического параметра суммарного стрессового воздействия на выращиваемые сельскохозяйственные растения аллелотоксичности почв после вегетации растений. Для проверки выдвинутого предположения было проведено изучение влияния подкормки трех сортов озимой пшеницы разными количествами азотных удобрений на изменение аллелотоксичности почв. Установлено, что сорта “Немчиновская 85”, “Московская 39” и “Лютесценс 982/08” реагируют на подкормку по-разному. Для сортов “Немчиновская 85” и “Лютесценс 982/08” увеличение дозы азотных удобрений приводит к снижению стрессовой реакции, которая заметно проявляется при недостатке в почве азота. Для сорта “Московская 39” высокие дозы азотных удобрений вызывают негативную реакцию усиления выделения аллелотоксинов. Это позволяет сделать вывод о том, что подкормку этого сорта азотом для предотвращения замедления развития растений следует проводить в несколько приемов. Таким образом, проведенные исследования подтвердили возможность использования аллелотоксичности почв после выращивания на них растений в качестве индикатора стрессов, вызываемых условиями выращивания и применением различных сельскохозяйственных приемов.

Ключевые слова: вегетация растений, факторы среды, мелкоделяночные опыты, подкормка азотными удобрениями, взаимосвязь урожайности и аллеловоздействия почв

DOI: 10.31857/S2686738922040138

В процессе вегетации растения испытывают влияние факторов среды, которые практически постоянно изменяются. Такие изменения нередко достигают опасных амплитуд и могут выступать в роли факторов, вызывающих состояние угнетения – стрессоров [1].

Ныне большинство исследователей сходятся во мнении [1], что стресс-реакция выполняет оперативную кратковременную защиту растительного организма от гибели в неблагоприятных условиях, а также инициирует формирование или

мобилизацию механизмов специализированной адаптации. С одной стороны, происходит ингибирование активных генов, которые в норме контролируют основные функции растительного организма – рост, развитие, фотосинтез и пр., а с другой – активируется система генов стрессовых белков и генов, контролирующих синтез специфических адаптогенов и протекторов. При этом большинство стрессовых реакций относят к неспецифическим, поскольку они мало зависят от природы стрессора и начинаются с повышения концентрации в клетках элиситоров [1].

В ответных реакциях на стресс растения перестраивают метаболизм, что отражается в замедлении вегетации. Следует отметить, что при стрессе происходит также выделение растениями в почву веществ, ингибирующих их вегетацию – аллелотоксинов [2–6].

¹ Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”, Московская область, Россия

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

*e-mail: tanyadunaeva12@mail.ru

Таким образом, для борьбы с последствиями действия стресс-факторов нужна энергия, и растения освобождают ее, замедляя вегетацию, что приводит к хорошо известному снижению урожайности сельскохозяйственных культур под влиянием стресса [7–9].

Можно предположить, что в результате накопления стрессовой нагрузки на вегетирующие растения (увеличения силы и продолжительности стрессов) количество аллелотоксинов в почве и, как следствие, ее аллелотоксичность (негативное влияние на растения) должны возрасти.

На основе изложенного выше можно указать два фактора, которые должны являться индикаторами суммарной стрессовой нагрузки – урожайность растений и аллелотоксичность почв.

Однако контроль действия стресс-факторов на растения по урожайности не может быть очень точным, во-первых, из-за большой ошибки определения урожайности в мелко-деляночных опытах. Во-вторых, урожайность отражает совокупность влияния на растения всех факторов на протяжении всего периода вегетации. В результате достаточно сложно оценить вклад какого-либо фактора в развитие растений на конкретном этапе между посевом и сбором урожая. С этих позиций аллелотоксичность почв, возникающая в процессе вегетации растений, может выступать в качестве легко определяемого параметра, способного характеризовать воздействие различных стресс-факторов на сельскохозяйственные культуры на любом этапе их развития.

Такая информация может быть весьма полезной с точки зрения выбора условий, при которых следует проводить выращивание сельскохозяйственных растений – способов полива, внесения удобрений, выбора пестицидов, порядка их использования и т.д.

Целью работы являлось изучение влияния подкормки разных сортов озимой пшеницы азотными удобрениями на проявление аллелотоксичности почв, а также проверка корреляции между урожайностью яровой пшеницы разных сортов и аллелотоксичностью почв после уборки урожая.

Объектами исследования выступали сорта яровой пшеницы (*Triticum L.*) “РИМА”, “Лиза”, “Агрос”, “Л459/3-15”, “Л460/2-15”, “Московская-35”, “Лада”, “Приокская”, “Эстер”, а также сорта озимой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) “Немчиновская 85”, “Московская 39”, “Лютесценс 982/08”.

Мелкоделяночные опыты проводили на базе ФГБНУ “ФИЦ “Немчиновка”, деревня Соколово, Новомосковского административного округа г. Москвы. Почва в районе проведения испытаний дерново-подзолистая среднесуглинистая на моренном суглинке.

Агрохимические свойства пахотного слоя для почв в опыте с яровой пшеницей: содержание гумуса – 1.91–2.00%, pH_{KCl} – 5.5–5.6; гидролитическая кислотность (H_T) – 1.53–1.84 ммоль/100 г; содержание P_2O_5 – 250–280 мг/кг; K_2O – 75–89 мг/кг. Перед посевом в почву вносили азотфоску из расчета 300 кг/га. В период вегетации проводили подкормку аммиачной селитрой из расчета 150 кг/га, а также разовую обработку инсектицидами баковой смеси.

Агрохимические свойства пахотного слоя для почв в опыте с озимой пшеницей: содержание гумуса 1.8–2.0%, pH_{KCl} – 5.3, содержание K_2O – 146 мг/кг, содержание P_2O_5 – 229 мг/кг. Агротехника возделывания озимой пшеницы в опыте – общепринятая для зоны. Предшественником озимой пшеницы служил чистый пар. Изучали 4 уровня азотного питания: N_0 , N_{60} , N_{120} , N_{180} кг/га д. в. аммиачной селитры ($N 34.4\%$) ГОСТ 2-85. Удобрения вносили вручную 2 раза: первый раз – после схода снега в фазу кушения – 60 кг/га д. в. (в вариантах N_{60} , N_{120} , N_{180}). Второй раз – перед выходом в трубку вносили 60 кг/га д. в. (в варианте N_{120}) и 120 кг/га д. в. (в варианте N_{180}).

Исследуемые сорта высевали селекционной сеялкой “Wintersteiger”.

Площадь делянок на яровой пшенице составляла 12 м², на озимой пшенице 10 м², повторность четырехкратная.

Уборку растений проводили селекционным комбайном “Wintersteiger”. Урожайность определяли путем взвешивания с учетом влажности образца. Данные урожайности приводили к 14% влажности и 100% чистоте.

Для определения аллелотоксичности почв проводили сравнительные испытания по развитию проростков семян тест культуры – яровой пшеницы сорт Лиза – в песке и почвах, отобранных после уборки урожая. При проведении этих экспериментов за 100% принимали развитие семян в песке и рассчитывали замедление или ускорение развития проростков семян почвой экспериментальных делянок.

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

При проведении экспериментов на дно чашки диаметром 95 мм помещали 30 г почвы или песка, затем ровным слоем размещали 7.5 г семян, а сверху – 30 г почвы или песка соответственно. После этого в чашку равномерно добавляли воду из мерной пипетки.

Семена, проросшие в песке/почве, отмывали от субстрата и помещали порциями в мерный ци-

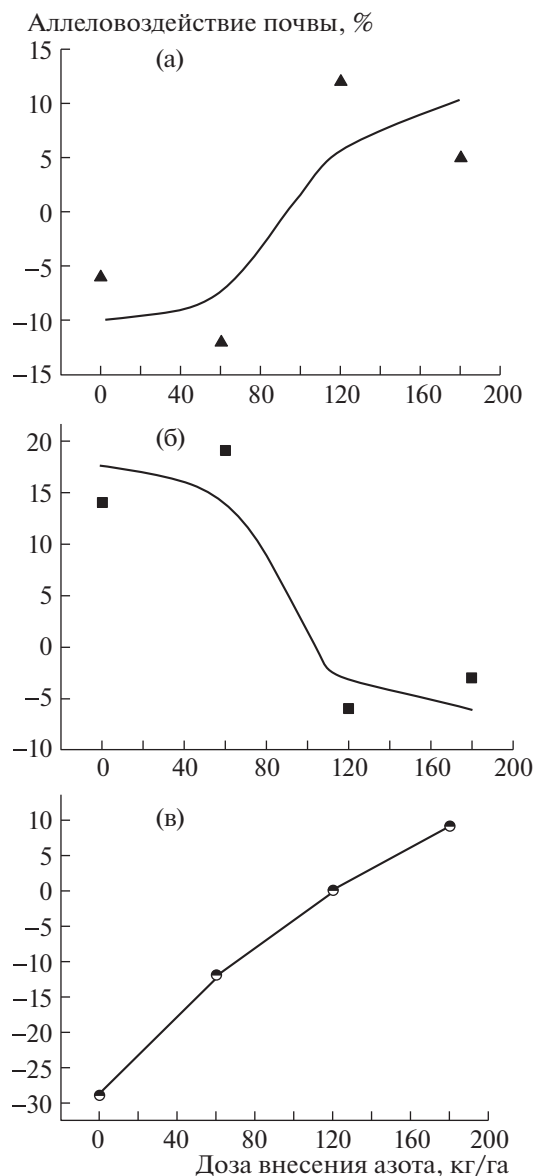


Рис. 1. Аллеловоздействие образцов дерново-подзолистой почвы на прорастание семян яровой пшеницы сорт "Лиза" после выращивания на этих почвах озимой пшеницы сортов "Немчиновская 85" (а), "Московская 39" (б) и линии "Лютесценс 982/08" (в), удобряемых различными дозами азота.

линдр на 100 мл с водой, размещенный на вибростол, колеблющемся с частотой 50 Гц. После помещения каждой порции проросших семян в цилиндр, которые создавали ажурную пористую структуру на них на 15–20 с, помещали небольшой грузик массой 8 г в виде резиновой пробки, что приводило к уплотнению структуры. После помещения всех проросших семян в цилиндр на них клали грузик и проводили дополнительное уплотнение структуры легкими постукиваниями (30–40) цилиндра с семенами о стол. Эти опера-

ции позволяли создать однородную структуру, а нижняя граница груза позволяла определять насыпной объем с точностью до 0.5 мл.

Применяли шестикратную повторность с последующей статистической обработкой результатов. Использование в одном опыте 1000–1200 семян позволяло рассчитывать доверительные интервалы с величиной, не превышающей 15%.

На первом этапе работы в мелкоделяночных опытах было изучено влияние внесения в почвы различных доз азотных удобрений на аллелотоксичность почв при выращивании на них различных сортов озимой пшеницы (рис. 1).

Из полученных данных хорошо видно, что все сорта по-разному реагируют на внесение азотных удобрений. Пшеница сорта "Немчиновская 85" хорошо отзывается на увеличение дозы азотных удобрений (рис. 1а), уменьшая выделение в почву аллелотоксинов. Конечная аллелотоксичность почв снижается с –10% (слабое угнетение) без внесения удобрений до +10% (слабая стимуляция) при внесении 180 кг/га. Похожим образом, но значительно сильнее, на внесение в почву удобрений реагирует озимая пшеница "Лютесценс 982/08" (рис. 1в). Без внесения азотных удобрений конечная аллелотоксичность почвы составляет –30% (среднее угнетение), т.е. отсутствие удобрений при выращивании этого сорта пшеницы является достаточно сильным стрессом для растений. При внесении азота в количестве 180 кг/га наблюдается заметное снижение выделения аллелотоксинов до слабой стимуляции (+10%).

Сорт озимой пшеницы Московская 39 (рис. 1б) реагирует несколько иначе. При малых дозах внесения азота количество выделяемых в почву аллелотоксинов весьма мало – почва обладает слабой стимулирующей способностью, а при росте дозы внесения азота начинает наблюдаться слабое угнетение. Если исходить из того, что выделение аллелотоксинов в почву характеризует реакцию растений на воздействие, то этот сорт желательно подкармливать малыми дозами несколько раз, так как в этом случае снизится величина стресс-фактора, возникающего за счет внесения в почву азота.

На втором этапе исследования было проведена проверка корреляции между урожайностью разных сортов яровой пшеницы и конечным аллеловоздействием¹ почв, на которых эти сорта выращивали, поскольку и урожайность, и конечное аллеловоздействие почв должны определяться суммарным действием стресс-факторов за период вегетации растений.

¹ Аллелотоксичность почв отражает только угнетающее воздействие почв на растения, в то время как аллеловоздействие может включать в себя и стимулирующее влияние.

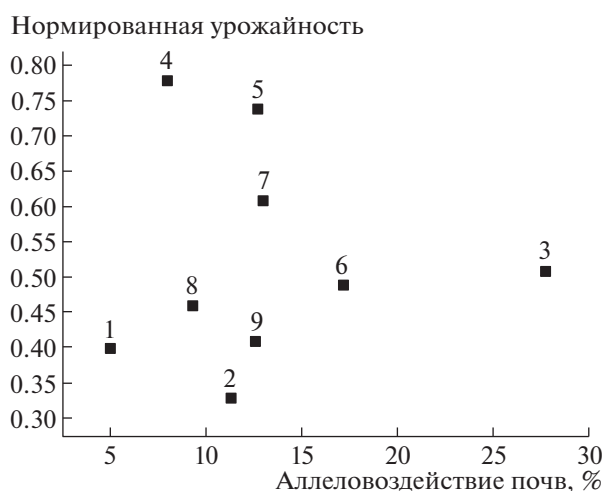


Рис. 2. Корреляция нормированной урожайности яровой пшеницы разных сортов в полевых испытаниях с конечным аллеловоздействием дерново-подзолистой почвы. Сорта пшеницы: 1 – “РИМА”; 2 – “Лиза”; 3 – “Агрос”; 4 – “Л459/3-15”; 5 – “Л460/2-15”; 6 – “Московская-35”; 7 – “Лада”; 8 – “Приокская”; 9 – “Эстер”.

Отметим, что в связи с разными генетическими особенностями сортов проводить сравнение их урожайности можно, только используя нормированную урожайность: т.е. текущую урожайность, отнесенную к потенциальной урожайности сорта в данном регионе.

Из полученных данных (рис. 2) хорошо видно, что корреляция между нормированной урожайностью и конечным аллеловоздействием почв не прослеживается, что, по-видимому, связано с узким диапазоном изменения аллеловоздействия и большой ошибкой при определении урожайности в мелколдьяночных опытах.

Представленные результаты свидетельствуют, что использование конечной аллелотоксичности (аллеловоздействия) почв в качестве параметра, характеризующего суммарное воздействие стресс-факторов на вегетирующие растения, может оказаться весьма полезным при определении стрессовых характеристик различных приемов, применяемых в сельском хозяйстве.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122011800459-3 “Почвенные биомаркеры: идентификация, устойчивость, активность, возможность использования для мониторинга”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. // Киев: Основа. 2010. 352 с.
2. *Allelopathy: a physiological process with ecological implications* // Eds. M.J. Reigosa, N. Pedrol, L. González. The Netherlands: Springer Science & Business Media. 2006. 637 p.
3. *Allelopathy: current trends and future applications* // Eds. Cheema Z.A., Farooq M., Wahid A. Berlin Heidelberg: Springer Science & Business Media. 2013. 513 p.
4. *Einhellig F.A.* Interactions involving allelopathy in cropping systems // *Agronomy Journal*. 1996. V. 88. № 6. P. 886–893.
5. *Inderjit, Moral D.R.* Is separating resource competition from allelopathy realistic? // *The Botanical Review*. 1997. V. 63. № 3. P. 221–230.
6. *Treutter D.* Significance of flavonoids in plant resistance: a review // *Environmental Chemistry Letters*. 2006. V. 4. № 3. P. 147–157.
7. *Путина О.В., Беседин А.Г.* Абиотические стресс-факторы и их влияние на накопление ассимилятов растениями и урожайность овощного гороха // *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019. Т. 180. № 2. С. 51–59.
8. *Lipiec J. et al.* Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review // *International Agrophysics*. 2013. V. 27. № 4. P. 463–477.
9. *Gholinezhad E. et al.* Study of the effect of drought stress on yield, yield components and harvest index of sunflower hybrid Iroflor at different levels of nitrogen and plant population // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2009. V. 37. № 2. P. 85–94.
10. *Федотов Г.Н. и др.* Влияние аллелотоксичности почв на прорастание семян зерновых культур // *Почвоведение*. 2019. № 4. С. 489–496.

PLANT STRESSES AND ALLELOTOXICITY OF SOILS

Academician of the RAS **B. I. Sandukhadze^a, G. N. Fedotov^b, N. V. Davydova^a, R. Z. Mamedov^a, V. A. Nardid^a, I. V. Gorepekin^b, M. S. Krakhmaleva^a, D. I. Potapov^b, A. O. Kazachenko^a, E. V. Savinov^a, and T. A. Gracheva^{b,#}**

^a Federal Research Center "Nemchinovka", Moscow region, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

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

It is known that stresses during the cultivation of agricultural plants reduce yields, but it is rather difficult to determine the magnitude and duration of stresses due to crop loss. It is also well known that stress factors lead to the release of allelotoxins by plants into the soil in which they vegetate. It is proposed to use allelotoxicity of soils after vegetation as a diagnostic parameter of the total stress effect on agricultural plants. To verify this assumption, change in soil allelotoxicity was studied after vegetation of three cultivars of winter wheat fed with different amounts of nitrogen fertilizers. It was established that cultivars "Nemchinovskaya 85", "Moskovskaya 39" and "Lutescens 982/08" react to fertilizing in different ways. For cultivars "Nemchinovskaya 85" and "Lutescens 982/08", an increase in the dose of nitrogen fertilizers leads to a decrease in the stress reaction. It is noticeably manifested when there is a lack of nitrogen in the soil. For the "Moskovskaya 39" cultivar, high doses of nitrogen fertilizers cause an adverse reaction of increased release of allelotoxins. It allows us to conclude that fertilizing this cultivar with nitrogen to prevent slowing down the development of plants should be carried out in several steps. Thus, the conducted studies have confirmed the possibility of using the allelotoxicity of the soil after growing plants on them as an indicator of stresses caused by growing conditions and the use of various agricultural techniques.

Keywords: vegetation of plants, environmental factors, small-scale experiments, fertilizing with nitrogen fertilizers, the relationship of yield and alleloeffects of soils

УДК 577.112.6:615.214.31

ПЕРВЫЙ ДИПЕПТИДНЫЙ МИМЕТИК НЕЙРОТРОФИНА-3: ДИЗАЙН И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2022 г. Член-корреспондент РАН Т. А. Гудашева^{1,*}, Н. М. Сазонова¹, А. В. Тарасюк¹,
И. О. Логвинов¹, Т. А. Антипова¹, Д. М. Никифоров¹,
П. Ю. Поварнина¹, академик РАН С. Б. Середенин¹

Поступило 02.04.2022 г.
После доработки 04.05.2022 г.
Принято к публикации 04.05.2022 г.

На основе структуры экспонированного участка 4-й петли нейротрофина-3 создан его димерный дипептидный миметик, гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (ГТС-301). Новое соединение сходно с полноразмерным нейротрофином, активировало рецепторы TrkC и TrkB. У ГТС-301 выявлена нейропротекторная активность в экспериментах на клетках гиппокампа мыши НТ-22 в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности в концентрациях 10^{-12} и 10^{-8} М соответственно и антидепрессантоподобная активность в тесте вынужденного плавания на мышах при 7-дневном внутрибрюшинном введении в дозах 10–40 мг/кг.

Ключевые слова: нейротрофин-3, миметик, дипептид ГТС-301, Trk-рецепторы, нейропротекторная активность, антидепрессивная активность

DOI: 10.31857/S2686738922040059

Нейротрофин-3 (NT-3), наряду с фактором роста нервов (NGF) и мозговым нейротрофическим фактором (BDNF), играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, миелинизации, поддержании жизнеспособности и фенотипической стабильности нейронов. В отличие от других нейротрофинов, NT-3 взаимодействует со всеми типами Trk рецепторов, активируя преимущественно TrkC, с меньшей аффинностью TrkB и с еще более низкой – TrkA [1]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале NT-3 для лечения неврологических и психических нарушений, таких как церебральная ишемия, тревожные расстройства, шизофрения, депрессия и др. [2, 3]. В частности, антидепрессантоподобные эффекты NT-3 при введении в зубчатую извилину гиппокампа крыс выявлены в тестах выученной беспомощности и вынужденного плавания [4]. Однако разработка фармакологических препаратов на основе полноразмерных нейротрофинов ограничена в связи с их макромолекулярной белковой природой, плохим проникновением через гематоэнцефалический

барьер и низкой устойчивостью в биологических средах. Поэтому альтернативой является создание низкомолекулярных миметиков нейротрофинов.

Целью данной работы было создание фармакологически активного дипептидного миметика NT-3.

По сравнению с NGF и BDNF, число низкомолекулярных миметиков NT-3, известных к настоящему времени, невелико. Так, канадской группой исследователей под руководством Бёрджесса (K. Burgess) и Сарагови (U.H. Saragovi) получены моновалентные миметики-частичные агонисты NT-3 на основе гетероциклических бета-поворотных шаблонов, включающих в себя дипептидные последовательности из первичной структуры NT-3 [5, 6]. Ими же синтезирован ряд бивалентных миметиков NT-3, содержащих в своей структуре фрагменты боковых радикалов аминокислотных остатков (а.к.о.), входящих в состав β -изгибов NT-3 [7, 8]. Поворотная конформация в этих соединениях закреплена с помощью триазольного кольца. Эти миметики активировали TrkC и проявляли нейропротекторный эффект *in vitro* [6, 8].

Однако в доступной литературе мы не обнаружили данных о фармакологических эффектах низкомолекулярных миметиков NT-3 *in vivo*.

Ранее в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова в целях создания фармакологических средств, об-

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “НИИ фармакологии имени В.В. Закусова”, Москва, Россия

*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru

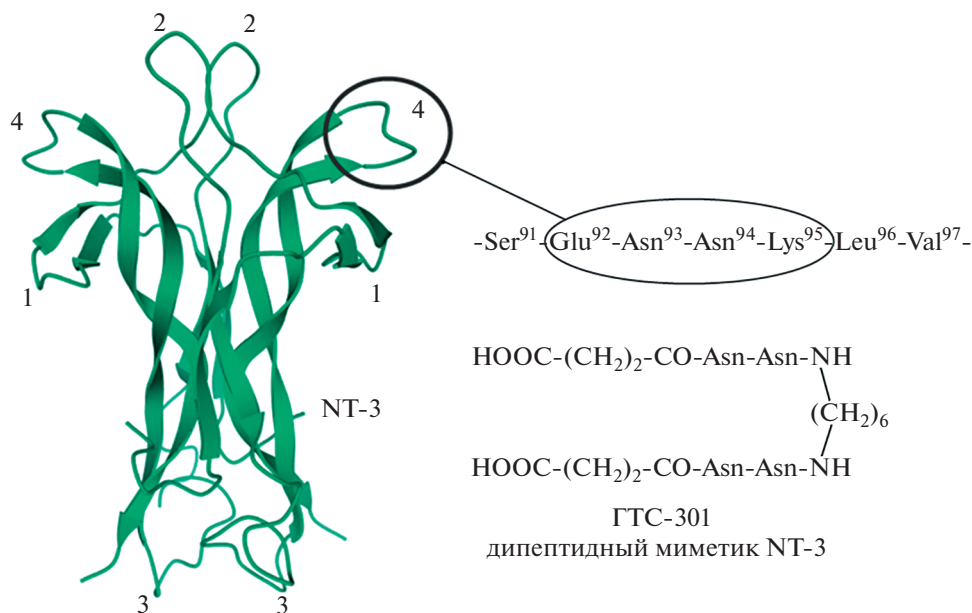


Рис. 1. Структура гомодимера нейротрофина-3 (pdb ID: 1NT3) и миметик ГТС-301.

ладающих свойствами NGF и BDNF, была предложена стратегия поиска димерных дипептидных миметиков нейротрофинов [9, 10], основная идея которой заключается в конструировании *N*-ацилдипептидных миметиков бета-поворотных фрагментов петель нейротрофина со стабилизацией поворотной конформации с помощью внутримолекулярной водородной связи между карбонилем *N*-ацильной группы и NH-группой C-концевого амида. При этом *N*-ацильная группа представляла собой биоизомер предшествующего а.к.о. Димерная структура нейротрофина имитировалась путем димеризации дипептида олигометиленамином по C-концу.

Для дизайна миметика NT-3 использовали пространственную информацию из его кристаллической структуры (pdb ID: 1NT3) (рис. 1). Подобно другим членам нейротрофинового семейства NT-3 представляет собой симметричный гомодимер, мономерные единицы которого содержат 7 бета-тяжей, образующих три антипараллельных β -листа. β -Тяжи связаны четырьмя экспонированными наружу нерегулярными участками, называемыми петлями: 1-я (остатки 29–33), 2-я (42–47), 3-я (остатки 58–75) и 4-я (91–97). Наиболее экспонированной является 4-я петля, фрагмент которой –Ser⁹¹–Glu⁹²–Asn⁹³–Asn⁹⁴–Lys⁹⁵–Leu⁹⁶– содержит в своей структуре серию поворотных участков. Для конструирования миметика нами был выбран фрагмент –Glu⁹²–Asn⁹³–Asn⁹⁴– как наиболее экспонированный и поэтому предположительно занимающий геометрически наиболее выгодное для взаимодействия с рецептором положение. При

конструировании мы сохраняли дипептидный фрагмент –Asn⁹³–Asn⁹⁴– как центральный фрагмент бета-поворот-подобного участка, а предшествующий а.к.о. Glu⁹² заменяли на его биоизомер – остаток янтарной кислоты. Димерную структуру нейротрофина воспроизводили с помощью гексаметилендиаминового спейсера. Таким образом, на основе структуры 4-й петли был сконструирован димерный дипептидный миметик NT-3, гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-аспарагинил-*L*-аспарагина) (ГТС-301) (рис. 1).

ГТС-301 синтезировали методами классического пептидного синтеза в растворе с использованием Вос-стратегии защитных групп и метода активированных пентафторфениловых эфиров, пептидную цепь наращивали с C-конца. Очистку проводили ОФ ВЭЖХ (Luna C18 50 × 250 мм, градиент 0–6% изопропанола в 0.1 М уксусной кислоте, 210 нм). Пептид ГТС-301 был хроматографически гомогенным по данным ТСХ и ОФ ВЭЖХ. Структура подтверждена ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопией и электроспрей-ионизационной масс-спектрометрией. Найдено, *m/z*: 773.34 [M + H]⁺; *m/z*: 771.33 [M – H][–]. C₃₀H₄₈N₁₀O₁₄. Рассчитано, *m/z*: 772.77. Диастереомерная чистота дипептида ГТС-301 по данным ЯМР составила не менее 98%.

Для выявления потенциала ГТС-301 как миметика NT-3, анализировали нейропротекторную активность соединения *in vitro*, способность активировать Trk рецепторы и антидепрессантоподобные свойства на экспериментальной модели *in vivo*.

Таблица 1. Нейропротекторная активность ГТС-301 в экспериментах *in vitro* (клетки линии НТ-22)

Соединение	Концентрация, М	Оптическая плотность (единицы оптической плотности)	Активность, % от максимально возможного эффекта ¹
Модель окислительного стресса			
– (контроль)	–	0.194 ± 0.004	–
H ₂ O ₂	1.5 · 10 ⁻³	0.098 ± 0.009*	–
НТ-3	10 ⁻⁹ (100 нг/мл)	0.146 ± 0.014 [^]	50
ГТС-301	10 ⁻⁵	0.128 ± 0.008 [^]	31
	10 ⁻⁶	0.130 ± 0.007 [^]	33
	10 ⁻⁷	0.128 ± 0.009 [^]	31
	10 ⁻⁸	0.124 ± 0.005 [^]	27
	10 ⁻⁹	0.129 ± 0.008 [^]	32
	10 ⁻¹⁰	0.128 ± 0.003 [^]	31
	10 ⁻¹¹	0.123 ± 0.009 [^]	26
	10 ⁻¹²	0.120 ± 0.012 [^]	23
10 ⁻¹³	0.112 ± 0.010	15	
Модель глутаматной токсичности			
– (контроль)	–	0.197 ± 0.009	–
глутаминовая кислота	5 · 10 ⁻³	0.155 ± 0.012*	–
НТ-3	10 ⁻⁹ (100 нг/мл)	0.186 ± 0.006 [^]	74
ГТС-301	10 ⁻⁵	0.171 ± 0.005 [^]	38
	10 ⁻⁶	0.176 ± 0.010 [^]	50
	10 ⁻⁷	0.166 ± 0.006 [^]	26
	10 ⁻⁸	0.167 ± 0.006 [^]	29
	10 ⁻⁹	–	–

Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений (M±SD).

¹ Активность рассчитывалась по формуле $A(\%) = (D_{\text{эксп}} - D_{\text{ак}}) / (D_{\text{контр}} - D_{\text{ак}}) \times 100\%$, где $D_{\text{эксп}}$ – оптическое поглощение раствора в опыте, $D_{\text{ак}}$ – оптическое поглощение раствора активного контроля (с повреждением), $D_{\text{контр}}$ – оптическое поглощение в пассивном контроле (без повреждения).

Достоверность отличий * $p \leq 0.05$ – от контроля; [^] $p \leq 0.05$ – от повреждения (по критерию Краскела–Уоллиса с последующим тестом по Данну).

Нейропротекторную активность ГТС-301 определяли в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности на клетках гиппокампа мыши НТ-22 как описано ранее [11]. НТ-3 (100 нг/мл, 3.4 · 10⁻⁹ М) либо ГТС-301 (10⁻¹³–10⁻⁵ М) вносили в среду за 24 ч до повреждения. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста.

На модели окислительного стресса ГТС-301 статистически значимо увеличивал жизнеспособность клеток в интервале концентраций 10⁻⁵–10⁻¹² М, при моделировании глутаматной токсичности – в диапазоне концентраций 10⁻⁵–10⁻⁸ М (табл. 1). В обоих опытах максимальный эффект ГТС-301 в 66–68% от наблюдаемого для НТ-3 зарегистрирован в концентрации 10⁻⁶ М.

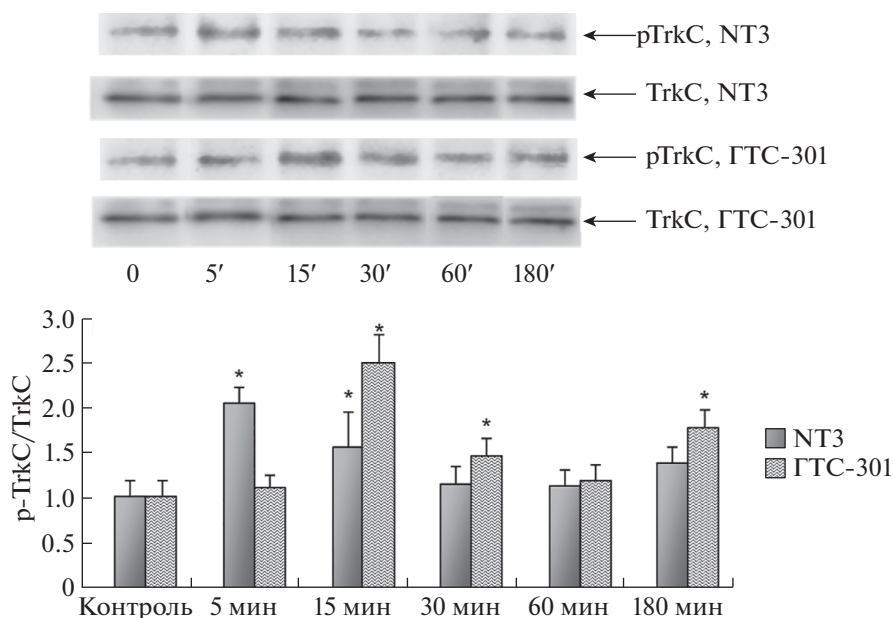


Рис. 2. Активация TrkC рецептора после внесения NT-3 100 (нг/мл) и ГТС-301 (10^{-6} М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии НТ-22. На рис. 2, 3 и 4 представлены оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии. Данные представлены в виде средних и стандартных отклонений ($M \pm SD$). Представленные данные являются средними значениями из трех независимых экспериментов. Достоверность отличий * $p \leq 0,05$ – от контроля (*U*-тест Манна–Уитни).

Способность ГТС-301 активировать разные Trk рецепторы изучена методом Вестерн-блот анализа на культуре клеток НТ-22 с использованием моноклональных антител к фосфорилированным формам pTrkA(Y490), pTrkB(Y515) и pTrkC(Y516). Выбор антител основан на литературных данных о механизмах активации постре-

цепторных сигнальных путей PI3K/АКТ и MEK/МАРК/ERK [12]. В качестве контроля использовали антитела к нефосфорилированным TrkA, TrkB и TrkC. Пробы лизировали через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после внесения NT-3 (100 нг/мл) или ГТС-301 (10^{-6} М). Временные интервалы выбраны исходя из результатов экспериментов по

Таблица 2. Эффекты ГТС-301 и Амитриптилина на время иммобильности мышей в тесте вынужденного плавания

Группа ($n = 9-11$)	Время иммобильности, с	Время иммобильности, % от контрольной группы
Эксперимент 1		
Контроль	199.9 \pm 7.8	
ГТС-301 (0.5 мг/кг)	207.5 \pm 15.5	103
ГТС-301 (1.0 мг/кг)	179.5 \pm 9.8	90
ГТС-301 (5.0 мг/кг)	189.5 \pm 11.8	95
ГТС-301 (10.0 мг/кг)	155.5 \pm 9.6* ($p = 0.026$)	78*
Амитриптилин (10.0 мг/кг)	148.0 \pm 10.4** ($p = 0.001$)	74**
Эксперимент 2		
Контроль	213.6 \pm 10.9	
ГТС-301 (20.0 мг/кг)	159.3 \pm 12.7** ($p = 0.004$)	74**
ГТС-301 (40.0 мг/кг)	156.4 \pm 9.0** ($p = 0.003$)	73**
Амитриптилин (10.0 мг/кг)	155.6 \pm 10.7** ($p = 0.002$)	73**

Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Статистическую оценку межгрупповых различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Даннета. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

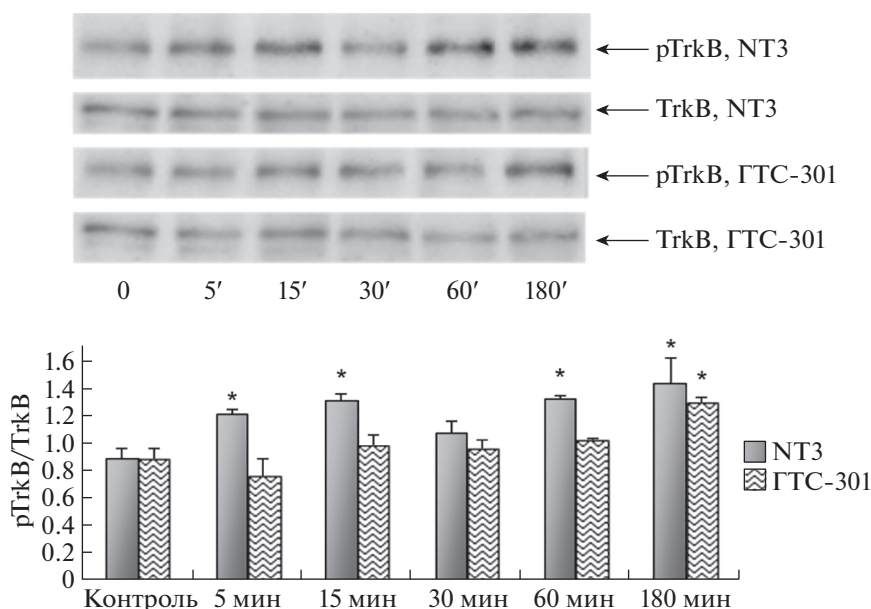


Рис. 3. Активация TrkB рецептора после внесения NT-3 (100 нг/мл) и ГТС-301 (10^{-6} М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии NT-22.

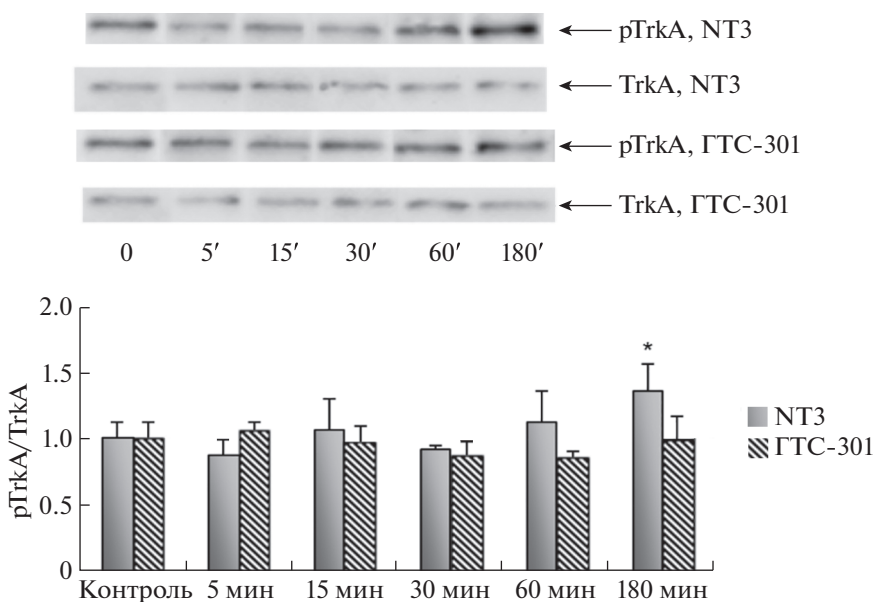


Рис. 4. Сравнение активации TrkA рецептора после внесения NT-3 (100 нг/мл) и ГТС-301 (10^{-6} М) в культуру клеток гиппокампа мыши линии NT-22.

фосфорилированию Trk дипептидными миметиками NGF и BDNF [13].

Активация TrkC, наиболее предпочтительного для NT-3, выявлена через 15, 30 и 180 мин инкубации с ГТС-301, и через 5 и 15 мин инкубации с NT-3, при этом через 15 мин наблюдали сходные эффекты миметика и полноразмерного нейротрофина (рис. 2).

Влияние ГТС-301 на TrkB было выявлено только в одной временной точке – через 180 мин, тогда как для NT-3 – через 5, 15, 60 и 180 мин после внесения. При этом выраженность активирующего влияния оказалась ниже, чем в случае TrkC рецепторов (рис. 3).

NT-3 активировал TrkA рецептор через 180 мин, а ГТС-301 в этих условиях был неэффективен (рис. 4).

Таким образом, ГТС-301 активирует более эффективно TrkC и, в меньшей степени, TrkB. Спектр активации Trk рецепторов миметиком ГТС-301 в целом повторяет таковой для полноразмерного NT-3. Полученная нами картина активации нейротрофином-3 тирозинкиназных рецепторов соответствует литературным данным [14].

Возможные антидепрессантоподобные эффекты ГТС-301 были изучены в тесте вынужденного плавания на мышах BALB/c. Тест проводили в модифицированной конфигурации с двумя посадками мышей в цилиндры с водой [15]. ГТС-301 в дозах 0.5–40 мг/кг вводили мышам субхронически (7 дней) внутрибрюшинно (в/б) в виде суспензии в растворе 1% Tween 80. В качестве положительного контроля использовали Амитриптилин (10 мг/кг, в/б, в физ. растворе). Контрольные мыши получали 1% раствор Tween 80. Спустя 24 ч после последнего введения препаратов проводили предварительную посадку мышей в цилиндры с водой на 10 мин, спустя еще 24 ч – 5-минутную тестовую посадку, в течение которой регистрировали время иммобильности.

Установлено, что в дозах 10–40 мг/кг ГТС-301 статистически значимо снижал время иммобильности мышей, что свидетельствует об антидепрессантоподобном эффекте дипептида (табл. 2). Выраженность эффекта ГТС-301 в дозах 20 и 40 мг/кг была такая же, как у классического антидепрессанта Амитриптилина.

Таким образом, сконструирован и синтезирован ГТС-301, димерный дипептидный миметик нейротрофина-3, активирующий преимущественно TrkC рецептор, проявляющий нейропротекторную активность в экспериментах *in vitro* в пиколярных концентрациях и обладающий антидепрессантоподобной активностью при системном введении. ГТС-301, помимо вероятной практической значимости, может служить молекулярным инструментом для изучения рецепторных взаимодействий, сопряжения активации TrkC рецептора с сигнальными путями и фармакологических эффектов как для полноразмерного NT-3, так и для малых молекул, имитирующих влияние этого нейротрофина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bothwell M.* NGF, BDNF, NT-3, and NT4. // *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2014. V. 220. P. 3–15.
2. *de Miranda A.S., de Barros JLVM, Teixeira A.L.* Is neurotrophin-3 (NT-3): a potential therapeutic target for depression and anxiety? // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2020. V.24. № 12. P. 1225–1238.
3. *Duricki D.A., Drndarski S., Bernanos M., et al.* Stroke Recovery in Rats after 24-Hour-Delayed Intramuscular Neurotrophin-3 Infusion. // *Annals of Neurology*. 2019. V. 85. № 1. P. 32–46.
4. *Shirayama Y., Chen A.C.-H., Nakagawa S., et al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. // *J Neurosci*. 2002. V. 22. № 8. P. 3251–3261.
5. *Pattarawarapan M., Zaccaro M.C., Saragovi U.H., et al.* New templates for syntheses of ring-fused, C(10) beta-turn peptidomimetics leading to the first reported small-molecule mimic of neurotrophin-3. // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002. V. 45. № 20. P. 4387–4390.
6. *Kempfle J.S., Duro M.V., Zhang A., et al.* A Novel Small Molecule Neurotrophin-3 Analogue Promotes Inner Ear Neurite Outgrowth and Synaptogenesis *In vitro*. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2021. V. 15. P. 666706.
7. *Zaccaro M.C., Lee H.B., Pattarawarapan M., et al.* Selective small molecule peptidomimetic ligands of TrkC and TrkA receptors afford discrete or complete neurotrophic activities. // *Chemistry & Biology*. 2005. V. 12. № 9. P. 1015–1028.
8. *Chen D., Brahim F., Angell Y., et al.* Bivalent peptidomimetic ligands of TrkC are biased agonists and selectively induce neurite outgrowth or potentiate neurotrophin-3 trophic signals. // *ACS Chemical Biology*. 2009. V. 18. № 4(9). P. 769–781.
9. *Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B.* Novel Technologies for Dipeptide Drugs Design and their Implantation. // *Curr Pharm Des*. 2018. V. 24. № 26. P. 3020–3027.
10. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Tarasiuk A.V., Seredenin S.B.* Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. // *Med Res Rev*. 2021. V. 41. № 5. P. 2746–2774.
11. *Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. и др.* Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro*. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 155, № 3. С. 319–322.
12. *Reichardt L.F.* Neurotrophin-regulated signalling pathways. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006. V. 361. № 1473. P. 1545–1564.
13. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B.* Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. // *J. Biomed. Sci*. 2015. V. 8. № 22. P. 106.
14. *Ip N.Y., Stitt T.N., Tapley P., et al.* Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. // *Neuron*. 1993. V. 10. № 2. P. 137–149.
15. *Angoa-Pérez M., Kane M.J., Briggs D.I., et al.* Mice genetically depleted of brain serotonin do not display a depression-like behavioral phenotype. // *ACS Chemical Neuroscience*. 2014. V. 5. № 10. P. 908–919.

THE FIRST DIPEPTIDE MIMETIC OF NEUROTROFIN-3: DESIGN AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

Corresponding Member of the RAS **T. A. Gudasheva^a, N. M. Sazonova^{a, #}, F. V. Tarasiuk^a, I. O. Logvinov^a,
T. A. Antipova^a, D. M. Nikiforov^a, P. Yu. Povarnina^a, and Academician of the RAS S. B. Seredenin^a**

^a *Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: tata-sosnovka@mail.ru*

The dimeric dipeptide mimetic, hexamethylenediamide bis-(N-monosuccinyl-L-asparaginyl-L-asparagine) (GTS-301) was created based on the structure of the exposed region of the neurotrophin-3 4th loop. The new compound as well as full-length neurotrophin, activated the TrkC and TrkB receptors. GTS-301 showed neuroprotective activity in experiments on HT-22 mouse hippocampal cells under conditions of oxidative stress and glutamate toxicity at concentrations of 10^{-12} and 10^{-8} M, respectively, and antidepressant-like activity in the forced swimming test on mice with 7-day intraperitoneal administration in doses 10-40 mg/kg.

Keywords: neurotrophin-3, mimetic, GTS-301 dipeptide, Trk receptors, neuroprotective activity, antidepressant activity

СТРОЕНИЕ МОЗГА МЕЛЬЧАЙШЕГО ЖЕСТКОКРЫЛОГО

© 2022 г. А. А. Макарова^{1,*}, А. А. Полилов¹

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 20.04.2022 г.

После доработки 09.05.2022 г.

Принято к публикации 09.05.2022 г.

Впервые описано строение мозга мельчайшего жесткокрылого *Scydosella musawasensis* Hall, 1999. Как и у других мельчайших жесткокрылых, мозг *S. musawasensis* несет признаки миниатюризации: смещение в грудной отдел, компактизация, малое число и размер нейронов. Показано, что несмотря на близость в размерном классе к миниатюрному перепончатокрылому *Megaphragma*, обладающему практически безъядерной нервной системой, строение мозга изученного мельчайшего жука сходно с таковым у крупных представителей отряда и характеризуется высоким числом ядер в мозге и значительным объемом клеточной коры. Нейропилль *S. musawasensis* занимает 60% от объема мозга, подтверждая правило нейропилярной константы.

Ключевые слова: мозг, миниатюризация, Ptiliidae, *Scydosella*

DOI: 10.31857/S2686738922040102

Размер тела – важная характеристика, во многом определяющая морфологию, физиологию и биологию вида [1]. Наибольших успехов в миниатюризации достигли Panarthropoda [2–6]. Показано, что экстремальное уменьшение размера тела у насекомых критически отражается на анатомии: способствуя значительным изменениям или трансформации всех, или почти всех систем органов [4]. Несмотря на высокую степень консервативности [7], миниатюризация нервной системы у насекомых сопровождается олигомеризацией и концентрацией ганглиев, асимметрией, значительным уменьшением числа и размера нейронов [4, 8]. В экстремальных случаях миниатюризации наблюдаются клеточные редукции [4].

Явление энуклеации клеточных ядер – редкое явление в животном мире. Наиболее известными безъядерными клетками являются эритроциты человека [9], энуклеация также описана и для клеток крови млекопитающих [10], саламандр [11], рыб [12] и насекомых [13]. Безъядерные клетки также были обнаружены в составе большинства систем органов половозрелых карликовых самцов циклиофор [14]. Однако безъядерные нейроны впервые были описаны для трех видов рода *Megaphragma* [15, 16]. После появления данных о явлении лизиса более 97% ядер нейронов на последних стадиях кукольного развития у

представителей рода *Megaphragma* возник вопрос о наличии этого явления в других группах мельчайших насекомых.

Аллометрический анализ отношения объема нейропиля к объему мозга показал, что у большинства насекомых относительный объем нейропиля изменяется строго изометрически [17]. На основе этого анализа было сформулировано правило нейропилярной константы, согласно которому относительный объем нейропиля мозга насекомых составляет в среднем 60% и остается постоянным независимо от размера тела. Это правило подтверждается на большинстве насекомых, за исключением мельчайшей *Megaphragma*, у которой отсутствует клеточная кора, в классическом понимании. Возник вопрос, сохраняется ли нейропилярная константа у мельчайших жесткокрылых?

В данной работе впервые описано строение мозга мельчайшего жесткокрылого насекомого *Scydosella musawasensis* Hall, 1999. Размер тела этих жуков составляет всего 325 мкм и на сегодняшний день они являются мельчайшими свободно живущими насекомыми в мире [18].

Материалом для работы послужили имаго *Scydosella musawasensis* Hall, 1999 (Ptiliidae), собранные в Национальном парке Чикаке, Колумбии в 2015 г. [18]. Длина тела 325–352 мкм. Изучение строения мозга проведено как описано ранее [16]. На базе полной серии гистологических срезов были выполнены трехмерные реконструкции мозга с использованием программ Bitplane Imaris и Blender. На основе трехмерных моделей были

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

*e-mail: amkrva@gmail.com

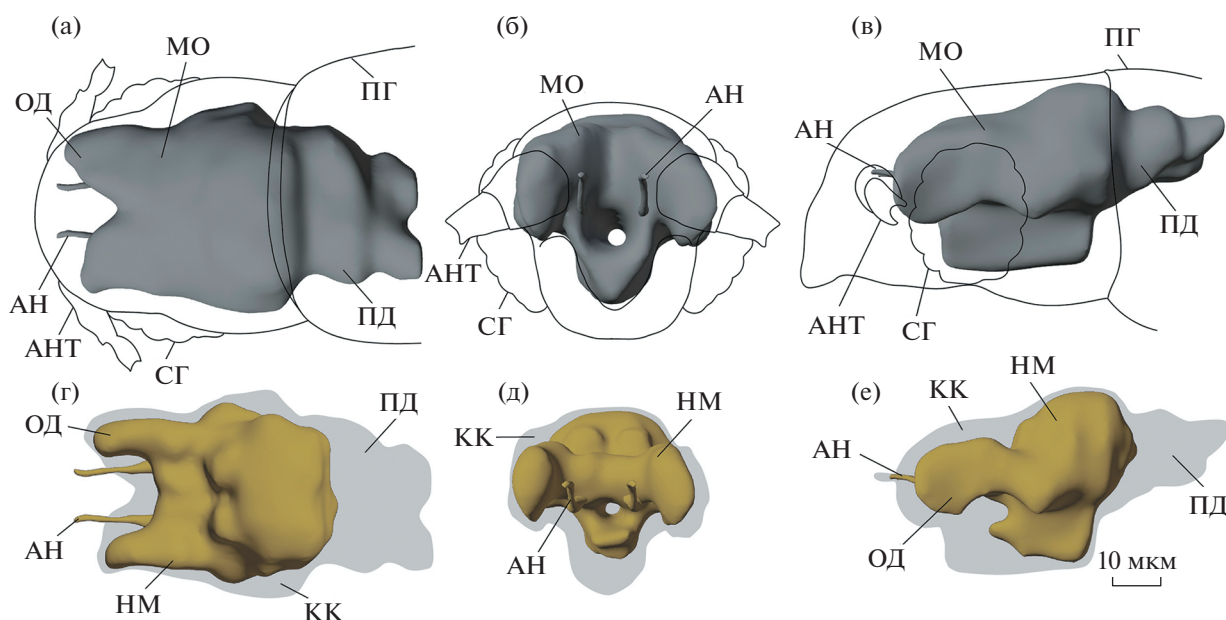


Рис. 1. Строения мозга *Scydosella musawasensis* (Ptiliidae), трехмерная реконструкция: (а), (г) – вид сверху; (б), (д) – вид спереди; (в), (е) – вид сбоку. (а) – (в) – общая топография мозга; (г) – (е) – соотношение клеточной коры и нейропиля. АН – антеннальный нерв; АНТ – антенны; КК – клеточная кора; МО – мозг; НМ – нейропиль мозга; ОД – выступающие оптические доли мозга; ПГ – переднегрудь; ПД – задние протоцеребральные доли мозга; СГ – сложные глаза.

вычислены объемы тела, мозга, нейропиля и клеточной коры. Линейные размеры тел клеток были посчитаны исходя из площади клеточной коры и числа ядер на десяти равноудаленных срезах, равномерно охватывающих весь мозг. Число клеток вычислено на основе объема клеточной коры и среднего размера тел клеток.

Мозг *S. musawasensis* имеет вытянутую форму, в отличие от мозга родственной *Nanosella* sp., который имеет округлую и компактную форму [8], отмечается легкая асимметрия задних протоцеребральных долей. Задняя протоцеребральная часть мозга представлена исключительно клеточной корой, и, подобно строению мозга у других микрожесткокрылых, смещена в переднегрудной отдел [8] (рис. 1). Оптические доли представлены четырьмя нейропилями: ламина (lamina ganglionaris), медулла (medulla externa), лобула (lobula) и лобулярная пластинка (lobula plate) (рис. 2). Медулла крупная, вытянутая в переднезадней плоскости, образует длинные выступы передней части мозга (рис. 1), по объему превышает все остальные оптические нейропили. Антеннальные доли крупные, вытянутые, имеют выраженную гломерулярную структуру. В области центрального комплекса идентифицируются вееровидное и эллипсоидное тела. В виду малого размера объекта идентификация протоцеребрального моста и грибовидных тел затруднена.

Абсолютный объем мозга составляет 0.045 нл, что в 2–3 раза меньше, чем у самых мелких из ра-

нее изученных жуков [17] и сходно с объемом мозга одного из мельчайших насекомых, *Megaphragma amalphitanum* (0.041 нл). Несмотря на сходный с *M. amalphitanum* размер тела и абсолютного объема мозга, *S. musawasensis* имеет значительный объем клеточной коры (рис. 2), составляющий около 42% от общего объема мозга. Таким образом, подтверждается правило нейропилярной константы, согласно которому у насекомых постоянное соотношение объемов нейропиля (60% от объема мозга) и клеточной коры (40% от объема мозга) [17]. При сравнимых размерах тела у *S. musawasensis* присутствует значительный объем клеточной коры, в то время как для имаго *M. amalphitanum* характерна почти полная утрата до 97% ядер нейронов на поздних стадиях кукольного развития. Вероятно, что явление лизиса ядер нейронов, объясняющее нарушение нейропилярной константы в случае с *Megaphragma*, отсутствует у миниатюрных жесткокрылых.

Число клеток в мозге *S. musawasensis* составляет примерно 9500, при среднем диаметре около 1.25 мкм. Сходное число нейронов в мозге отмечено для мельчайшего из ранее изученных жесткокрылых *Nanosella* sp. (длина тела около 400 мкм, около 8000 клеток в мозге) [4].

Несмотря на малое число и размер нейронов, *S. musawasensis* обладают большим относительным объемом мозга, как и большинство других микронасекомых, за исключением отдельных ли-

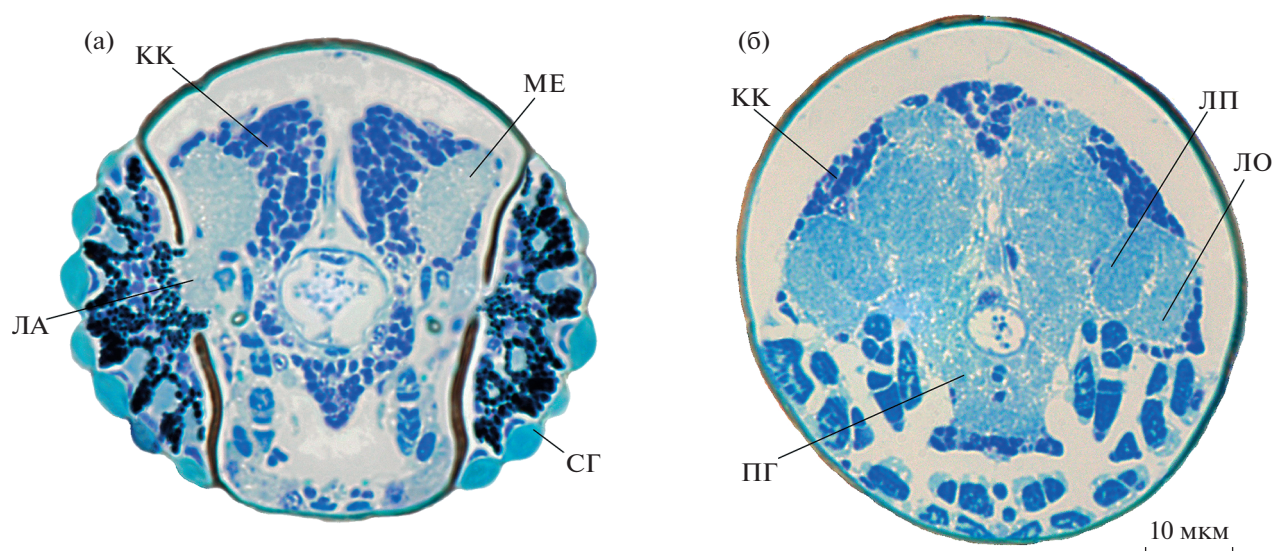


Рис. 2. Строение мозга *Scydosella musawasensis* (Ptiliidae), гистология: (а) – поперечный срез через сложные глаза; (б) – поперечный срез задней части головной капсулы. КК – клеточная кора; ЛА – ламина; МЕ – медулла; ЛО – лобула; ЛП – лобулярная пластинка; ПГ – подглоточный ганглий; СГ – сложные глаза.

ний *Trichogramma* [19] и *Nasonia* [20]. Относительный объем мозга *S. musawasensis* существенно больше, чем у крупных жесткокрылых [4], и составляет около 4%.

Таким образом, миниатюризация в разных группах насекомых по-разному влияет на строение мозга. У жесткокрылых и трипсов имеется широкая шея, что делает голову менее подвижной, а также позволяет мозгу не ограничиваться головной капсулой и частично смещаться в грудной отдел [4]. У перепончатокрылых, напротив, благодаря тонкой и узкой шее, голова более подвижная, а мозг оказывается строго ограничен головной капсулой и крайне компактизован [4]. Крайняя миниатюризация у *Megaphragma* привела к экстремальным адаптациям – редукциям ядер и тел нейронов, однако не отразилась на клеточном строении мозга у мельчайшей *Scydosella*.

Несмотря на крайнюю консервативность строения мозга, морфологические адаптации к миниатюризации могут существенно отличаться у насекомых с экстремально малым размером тела.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ, проект № 19-74-10019.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hanken J.* Miniaturization and its effects on cranial morphology in plethodontid salamanders, genus *Thori-us* (Amphibia, Plethodontidae): II. The fate of the brain and sense organs and their role in skull morphogenesis and evolution // *Journal of Morphology*. 1983. V. 177. P. 255–268.
2. *Dunlop J.A.* Miniaturisation in Chelicerata // *Arthropod Structure and Development*. 2019. V. 48. P. 20–43.
3. *Gross V., Treffkorn S., Reichelt J., et al.* Miniaturization of tardigrades (water bears): Morphological and genomic perspectives // *Arthropod Structure and Development*. 2019. V. 48. P. 12–19.
4. *Polilov A.A.* At the size limit – effects of miniaturization in insects. Dordrecht: Springer; 2016.
5. *Minelli A., Fusco G.* No limits: Breaking constraints in insect miniaturization // *Structure and Development*. 2019. V. 48. P. 4–11.
6. *Eberhard W.G.* Miniaturized orb-weaving spiders: Behavioural precision is not limited by small size // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2007. V. 274. P. 2203–2209.
7. *Niven J.E., Farris S.M.* Miniaturization of nervous systems and neurons // *Current Biology*. 2012. V. 22. P. R323–R329.
8. *Макарова А.А., Полилов А.А.* Особенности строения и ультраструктуры головного мозга насекомых, связанные с миниатюризацией. I. Мельчайшие жесткокрылые – жуки-перокрылки (Coleoptera, Ptiliidae) // *Зоологический журнал*. 2013. Т. 92, С. 523–533.
9. *Migliaccio A.R.* Erythroblast enucleation // *Haematologica*. 2010. V. 95. P. 1985–1988.
10. *Moras M., Lefevre S.D., Ostuni M.A.* From erythroblasts to mature red blood cells: Organelle clearance in mammals // *Frontiers in Physiology*. 2017. V. 8. P. 1076.
11. *Mueller R.L., Gregory T.R., Gregory S.M., et al.* Genome size, cell size, and the evolution of enucleated erythrocytes in attenuate salamanders // *Zoology*. 2008. V. 111. P. 218–230.

12. Niimi G., Imada H. Observation of non-nucleated erythrocytes in the peripheral blood of medaka, *Oryzias latipes* // *Okajimas Folia Anatomica Japonica*. 2008. V. 85. P. 1–3.
13. Bozler J., Kacsóh B.Z., Bosco G. Nematocytes: Discovery and characterization of a novel anculeate hemocyte in *Drosophila falleni* and *Drosophila phalerata* // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0188133.
14. Neves R.C., Reichert H. Microanatomy and development of the dwarf male of *Symbion pandora* (phylum Cycliophora): New insights from ultrastructural investigation based on serial section electron microscopy // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0122364.
15. Polilov A.A. First record of *Megaphragma* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in Columbia, and third animal species known to have anucleate neurons // *Journal of Hymenoptera Research*. 2017. V. 60. P. 181–185.
16. Polilov A.A. Anatomy of adult *Megaphragma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), one of the smallest insects, and new insight into insect miniaturization // *PLoS One*. 2017. V. 12. P. e0175566.
17. Polilov A.A., Makarova A.A. Constant neuropilar ratio in the insect brain // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. P. 21426.
18. Polilov A.A. How small is the smallest? New record and remeasuring of *Scydosella musawasensis* Hall, 1999 (Coleoptera, Ptiliidae), the smallest known free-living insect // *Zookeys*. 2015. V. 526. P. 61–64.
19. van der Woude E., Smid H.M., Chittka L., et al. Breaking Haller's rule: Brain-body size isometry in a minute parasitic wasp // *Brain, Behavior and Evolution*. 2013. V. 81. P. 86–92.
20. Groothuis J., Smid H.M. *Nasonia* Parasitic wasps escape from Haller's rule by diphasic, partially isometric brain-body size scaling and selective neuropil adaptations // *Brain, Behavior and Evolution*. 2017. V. 90. P. 243–254.

STRUCTURE OF THE BRAIN OF THE SMALLEST COLEOPTERA

A. A. Makarova^{a,#} and A. A. Polilov^a

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

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

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

The structure of the brain of the smallest Coleoptera, *Scydosella musawasensis* Hall, 1999, is described for the first time. As in other extremely small beetles, the brain of *S. musawasensis* displays signs of miniaturization: displacement to the thorax, compactization, and a small number and size of the neurons. The body size of the studied smallest beetle is similar to that of the minute hymenopteran *Megaphragma*, which has a nearly anucleate nervous system, but the structure of the brain of the beetle is similar to those of large representatives of the order Coleoptera, and is characterized by the presence of a normal cell body rind.

Keywords: brain, miniaturization, Ptiliidae, *Scydosella*

УДК 57.086.13

ВЛИЯНИЕ АКУСТИКО-МЕХАНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2022 г. Е. Н. Пономарева^{1,2}, М. М. Белая^{1,*}, А. В. Фирсова¹, А. А. Красильникова^{1,2}

Представлено академиком РАН Г.Г. Матишовым

Поступило 28.04.2022 г.

После доработки 09.05.2022 г.

Принято к публикации 09.05.2022 г.

Применение различных видов стимуляции сперматозоидов рыб с целью повышения выживаемости дефростированных клеток является перспективным направлением в области низкотемпературного консервирования. В статье впервые исследовано применение акустико-механического воздействия на сперму осетровых рыб, в частности, стерляди. Приведены технические характеристики собранной экспериментальной установки для акустико-механического воздействия на сперму рыб. В результате проведенных работ подобраны оптимальные параметры воздействия для повышения сохранения дефростированных репродуктивных клеток.

Ключевые слова: криоконсервация, репродуктивные клетки рыб, осетровые, акустико-механическое воздействие

DOI: 10.31857/S2686738922040126

Сохранение и поддержание численности популяций многих видов рыб в настоящее время возможны только с помощью искусственного воспроизводства, особенно это касается рыб с длинным циклом развития, таких как осетровые.

К настоящему времени на предприятиях по воспроизводству, восстановлению природных популяций рыб и фермах по товарному производству создают маточные стада, проводят искусственное оплодотворение икры и выращивают молодь, которую затем выпускают в естественные водоемы или используют для дальнейшего выращивания товарного продукта. Однако использование ограниченного количества производителей из маточного стада приводит к инбридингу (близкородственному скрещиванию) и негативным образом влияет на получаемое потомство.

В связи с этим перспективным направлением на сегодняшний день остается криоконсервация

репродуктивных клеток рыб с последующим использованием их в целях искусственного воспроизводства видов. Наличие криобанка репродуктивных клеток рыб позволяет сократить расходы на содержание недоброкачественных производителей, дает возможность использовать репродуктивные клетки в любое удобное время, а также проводить обмен образцами генетического материала между предприятиями.

В настоящее время разработаны методики низкотемпературного консервирования репродуктивных клеток, в частности спермы, достаточно большого количества рыб. Однако не всегда удается получать стабильные результаты по выживаемости дефростированных сперматозоидов, что указывает на необходимость проведения дальнейших исследований в этой области и определяет перспективность этого направления.

Одним из вариантов улучшения качества криоконсервированных репродуктивных клеток является воздействие на них в процессе низкотемпературного консервирования факторов различной природы (механических, химических, физических). В результате улучшается проникновение протекторов внутрь клеток, повышается их защитное действие, и, в конечном итоге, увеличивается процент выживаемости спермиев.

Большинство работ, направленных на использование различных воздействий на сперму для улучшения ее репродуктивных качеств, проведе-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук”, Ростов-на-Дону, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия

*e-mail: mashabogat@gmail.com



Рис. 1. Экспериментальная установка для акустико-механического воздействия на сперму рыб.

но на сельскохозяйственных животных. А.Н. Калгин (2008) [1] предлагает использовать одиночный кратковременный электроимпульс напряжением 1.5 В; Н.П. Кунденко (2012) [2] описывает установки на основе открытых резонаторов, образованных сферическим и плоским зеркалами, которые используются для воздействия акустическими колебаниями на микрообъекты животных перед их криоконсервацией; разработаны способ криоконсервации биологических образцов под давлением и устройство для его осуществления [3]. Ряд работ [4–6] посвящены воздействию ультразвуковых волн для оптимизации условий низкотемпературного консервирования спермы сельскохозяйственных животных.

В 2021 г. Южный научный центр Российской академии наук совместно с Донским государственным техническим университетом начал исследования по акустико-механическому воздействию на сперму рыб с использованием пьезоактуаторов.

Пьезоактуаторы – это специальные сверхпрецизионные короткоходные линейные электроприводы. Они преобразуют электрическую энергию в небольшое, но крайне точно контролируемое линейное перемещение с высоким развиваемым усилием. В основе принципа их действия лежит обратный пьезоэлектрический эффект, т.е. механическая деформация кристалла (пьезокерамики) при воздействии на него электрического поля. При этом осуществляется возвратно-поступательное движение или другие его виды.

Нами впервые предложено применение акустико-механического воздействия на замораживаемый материал, что, как мы считаем, позволит увеличить сохранность клеток во время двойного температурного шока. Это позволит ускорить проникновение криозащитных веществ через клеточные мембраны, предположительно снизив период эквilibрации, тем самым уменьшив вре-

мя взаимодействия клеток с токсичными криопротекторами, и повысить выживаемость. Биологические эффекты акустико-механических воздействий, проводимых в период эквilibрации, обусловлены, вероятно, изменением проницаемости мембран клеток сперматозоидов рыб, увеличивается скорость диффузии раствора криопротектора внутрь клеток, поток ионов K^+ из клетки вовне в результате облегчения пассивной диффузии и смещение глобул белков, расположенных на поверхности мембран.

Пьезоактуатор [7, 8] представляет собой круглую пластину диаметром 0.02 м. Пластина приклеена с внешней стороны по центру ко дну стандартного стеклянного лабораторного низкого градуированного стакана В-1-50 ХС. Стакан имеет следующие размеры: объем 50 мл, диаметр 38 ± 1.0 мм, высота 70 ± 2 мм.

Суспензия заполняет стакан примерно на одну треть его высоты и имеет температуру около $4^\circ C$. Эксперимент проводится при комнатной температуре (рис. 1).

Рабочим элементом пьезоактуатора является пьезоэлемент из пьезокерамики PZT-4 толщиной 0.003 м, предварительно поляризованный по толщине. Лицевые поверхности пьезоактуатора электродированы способом вжигания серебра и к ним подведены электрические провода. Толщины нанесенных электродов пренебрегаем ввиду их малости. Внешняя поверхность электродов покрыта эпоксидной смолой толщиной 0.001 м, выполняющей роль защитного слоя.

По электрическим проводам на электроды подается переменная разность потенциалов по гармоническому закону с амплитудой V_0 .

Дно стакана и пьезоэлемент образуют полупассивный биморф, поэтому приложение переменной разности потенциалов на электроды пьезоэлемента приводит к поперечным колебаниям дна емкости. Это вызывает установившиеся колебания пьезоактуатора и соответственно стакана. Создаваемое акустическое поле в суспензии в свою очередь приводит к акустическому воздействию на репродуктивные клетки рыб. При этом рабочей частотой является первая частота изгибных колебаний дна емкости.

В качестве объекта исследований использовали репродуктивные клетки самцов стерляди (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602.

После получения половых продуктов самцов рыб и доставки их в лабораторию оценивают качество спермы. Для этого на предметное стекло помещают каплю спермы и смешивают с речной водой в соотношении 1 : 200. Под микроскопом оценивают процентное соотношение сперматозоидов с поступательным и колебательным дви-

жением по шкале Г.М. Персова, а также устанавливают время подвижности спермиев с помощью секундомера. Затем приступают к процессу криоконсервации: разбавление спермы криосредой в соотношении 1 : 1, эквilibрация в течение 40 мин, замораживание с применением программируемого замораживателя, хранение образцов в жидком азоте, размораживание и оценка качества дефростированного материала [9, 10].

При проведении экспериментальных работ перед эквilibрацией проводилось акустико-механическое воздействие с заданными параметрами.

Экспериментальная установка, предназначенная для возбуждения акустических волн в жидкостях, состоит из следующих элементов: пробирка с наклеенным на нее пьезоэлектрическим преобразователем, функциональный генератор сигналов Tektronix AFG 3022B, усилитель сигнала на основе пьезодрайверов и осциллограф LeCroy Wavesurfer 422. С помощью функционального генератора формируется синусоидальная волна с заданной частотой и амплитудой. Затем этот сигнал подается на усилитель и далее на пьезопреобразователь. Преобразователь представляет собой диск, изготовленный из пьезоэлектрического материала, который за счет пьезоэлектрического эффекта позволяет преобразовывать электрический сигнал в механические колебания. Последние, в свою очередь, передаются пробирке и жидкости, находящей внутри нее. Между преобразователем и усилителем подключен в параллель осциллограф, позволяющий контролировать выходные характеристики усиленного сигнала.

В экспериментах использовали следующие параметры акустико-механического воздействия на икру стерляди: 20 Гц (А), 500 Гц (В), 5.8 кГц (С), напряжение 10–15 В, время воздействия составило 1 мин. В результате улучшается проникновение криопротектора внутрь половых клеток и в конечном итоге после дефростирования качество спермы значительно повышается. Результаты представлены на рис. 2.

В результате акустико-механического воздействия на сперму стерляди отмечено, что разные параметры времени, частоты и длины волны могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на репродуктивные качества дефростированных спермиев. Отмечено, что при увеличении времени воздействия выше 2 мин и частоты до 5 кГц и изменение длины волны приводит к высоким повреждениям клеток после дефростации.

Новый методологический подход к низкотемпературному консервированию репродуктивных клеток рыб с применением акустико-механического воздействия открывает большие возможности для создания новых эффективных методов глубокого замораживания.

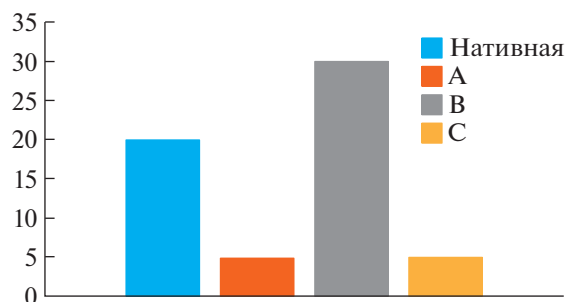


Рис. 2. Подвижность дефростированных сперматозоидов стерляди, %, 20 Гц (А), 500 Гц (В), 5.8 кГц (С), напряжение 10–15 В, время воздействия – 1 мин.

Таким образом, акустико-механическое воздействие можно применять для улучшения репродуктивных качеств спермы осетровых рыб, однако полученные результаты можно считать предварительными, требуется дальнейшее проведение исследований по оценке оплодотворяющей способности клеток после дефростации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работы выполнены с использованием Биоресурсной коллекции редких и исчезающих видов рыб ЮНЦ РАН № 73602 при финансовой поддержке гранта РФ № 21-16-00118.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Калгин Д.Н.* Эффективность активации подвижности спермиев рыб с помощью физико-химических стимуляторов в дефростированной семенной жидкости // *Ветеринарная патология*. 2008. № 2. С. 149.
2. *Кунденко Н.П.* Анализ характеристик открытого резонатора для измерения диэлектрической проницаемости жидких биологических веществ // *Вісник національного технічного університету "ХП"*. 2012. Вип. № 26/2012. С. 50–55.
3. *Кобелев А.В., Пеньков Н.В., Гольяев М.В., Бирюков С.В., Гагаринский Е.Л., Каурова С.А., Швирст Н.Э., Уграицкая С.В., Шишова Н.В., Фесенко Е.Е.* Способ криоконсервации биологических образцов под давлением и устройство для его осуществления / Патент РФ на изобретение. 2018.
4. *Шишова Н.В., Ескин Г.В., Комбарова Н.А., Пашовкин Т.Н., Федорова Е.В.* Влияние ультразвуковой обработки на стабильность лактозо-глицерино-желточного разбавителя спермы и выживаемость сперматозоидов быка при криоконсервации // *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2011. 4, спецвыпуск. С. 164–169.
5. *Пиротти Е.Л., Михайлова Л.Н.* Исследования проблемы воздействия ультразвуковых волн в процессе криоконсервации // *Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит*. 2012. № 11 (105). С. 62–65.

6. Кунденко Н.П., Михайлова Л.Н. Влияние низкоинтенсивных акустических колебаний в процессе криоконсервации // Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит. 2014. № 1 (119). С. 58–63.
7. Shevtsov S.N., Soloviev A.N., Parinov I.A., Cherpakov A.V., Chebanenko V.A. Piezoelectric Actuators and Generators for Energy Harvesting. Springer, 2018. P. 151–154.
8. Choi S.-B., Han Yo-M. Piezoelectric actuators: control applications of smart materials. CRC Press, 2010. P. 77–81.
9. Цветкова Л.И., Савушкина С.И., Титарева Л.Н., Докина О.Б., Пронина Н.Д. Методическое пособие по криоконсервации спермы карпа, лососевых и осетровых видов рыб. М.: ВНИИПРХ, 1997. 11 с.
10. Богатырева М.М. Оптимизация методов криоконсервации спермы для сохранения генофонда осетровых рыб: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.06 / Астраханский государственный технический университет. Астрахань, 2010. 20 с.

INFLUENCE OF ACOUSTIC-MECHANICAL IMPACT ON THE REPRODUCTIVE QUALITIES OF STURGEON SPERM DURING CRYOPRESERVATION

E. N. Ponomareva^{a,b}, M. M. Belaya^{a,#}, A. V. Firsova^a, and A. A. Krasilnikova^{a,b}

^a Federal State Budgetary Institution of Science “Federal Research Centre The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences”, Rostov-on-Don, Russian Federation

^b Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

#e-mail: mashabogat@gmail.com

Presented by Academician of the RAS G.G. Matishov

The use of various types of stimulation of fish spermatozoa in order to increase the survival of defrosted cells is a promising direction in the field of low-temperature preservation. In the article, for the first time, the use of acoustic-mechanical effects on the sperm of sturgeons, in particular, sterlet, was studied. The technical characteristics of the assembled experimental setup for acoustic-mechanical effects on fish sperm are given. As a result of the work carried out, the optimal parameters of exposure were selected to increase the preservation of defrosted reproductive cells.

Keywords: cryopreservation, reproductive cells of fish, sturgeon, acoustic-mechanical impact

УДК 57.086.13

ВАРИАБЕЛЬНЫЙ САЙТ CTCF ИЗ ИНТРОНА ГЕНА *UBX* *DROSOPHILA MELANOGASTER* ЯВЛЯЕТСЯ ИЗБЫТОЧНЫМ И НЕ ИМЕЕТ ИНСУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2022 г. А. Н. Ибрагимов^{1,*}, О. В. Былино¹, О. В. Кырчанова¹, Ю. В. Шидловский¹, R. White²,
P. Schedl³, академик РАН П. Г. Георгиев¹

Поступило 30.04.2022 г.

После доработки 09.05.2022 г.

Принято к публикации 09.05.2022 г.

CTCF является наиболее изученным и консервативным архитектурным белком хроматина, который был найден у дрозофилы и млекопитающих. CTCF преимущественно связывается с промоторами и инсуляторами и может участвовать в формировании хроматиновых петель. В группе сайтов, названных вариабельными, связывание CTCF зависит от эпигенетического статуса окружающего хроматина. Так, вариабельный сайт CTCF (*vCTCF*), обнаруженный в интроне гена *Ubx*, находится в непосредственной близости к энхансерам *BRE*, *abx*. CTCF связывается с вариабельным сайтом только в тканях, в которых ген *Ubx* активен, что дало основание предполагать роль *vCTCF* в формировании контактов между *Ubx* промотором и энхансерами *BRE*, *abx*. С помощью метода CRISPR/Cas9 и *attP/attB* сайт-специфической интеграции мы исследовали функциональную роль *vCTCF* и показали, что его отсутствие не приводит к дефектам развития. Также фрагмент 2161 п.н., содержащий *vCTCF*, не является эффективным инсулятором на месте границы *Fab-7* локуса *VX-C*. Таким образом, *vCTCF* имеет избыточные функции в регуляции экспрессии *Ubx*.

Ключевые слова: инсуляторы, CTCF, Bithorax complex, *Ubx*

DOI: 10.31857/S2686738922040060

Парасегмент-специфичная экспрессия трех гомеозисных генов *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* комплекса Bithorax (*VX-C*) *Drosophila melanogaster* регулируется девятью автономными регуляторными доменами, которые разделены специальными регуляторными элементами, названными границами [1]. Границы обеспечивают автономность путем блокировки контактов между регуляторными элементами из соседних доменов. Кроме того, границы также могут предотвращать взаимодействие энхансеров с промотором [2–4]. Помимо инсуляторной активности границы обладают способностью специфично взаимодействовать с целевыми генами *VX-C*, позволяя энхансерам, расположенным в регуляторных доменах, стимулировать соответствующие промоторы [5]. Эти свойства границ обеспечивают правильную экс-

прессию *VX-C* генов в соответствующих парасегментах и определенные временные интервалы развития дрозофилы. Так, было показано, что границы *Fab-6*, *Fab-7* и *Fab-8* специфично взаимодействуют с предпромоторной областью *Abd-B*, чем, вероятно, и обуславливают правильное позиционирование соответствующих доменов (*iab5–iab7*) в парасегментах 10–12 [6].

Большая часть границ регуляторных доменов *VX-C* содержат сайты связывания для дрозофилиного гомолога белка CTCF (*dCTCF*), которые определяют инсуляторную активность границ (рис. 1) [7]. В интроне гена *Ubx* был обнаружен вариабельный сайт связывания *dCTCF* (*vCTCF*), который находится на расстоянии 30 тпн ниже промотора (рис. 1) [8]. *dCTCF* не связывается с этим сайтом в тканях, в которых *Ubx* неактивен (имагинальные диски первой пары ног), но связывается с ним в транскрипционно активном локусе *Ubx* (имагинальные диски третьей пары ног). Было показано, что связывание *dCTCF* с *vCTCF* сайтом сопряжено с изменениями в топологии *abx/bx* регуляторного домена: в тканях, в которых *Ubx* активен, наблюдается увеличение частоты контактов *vCTCF* сайта с промотором *Ubx* [8]. Была предложена модель, в соответствии с которой

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Российская Федерация

² Кембриджский университет, Кембридж, Великобритания

³ Принстонский университет, Принстон, США

*e-mail: airat.ibra@gmail.com

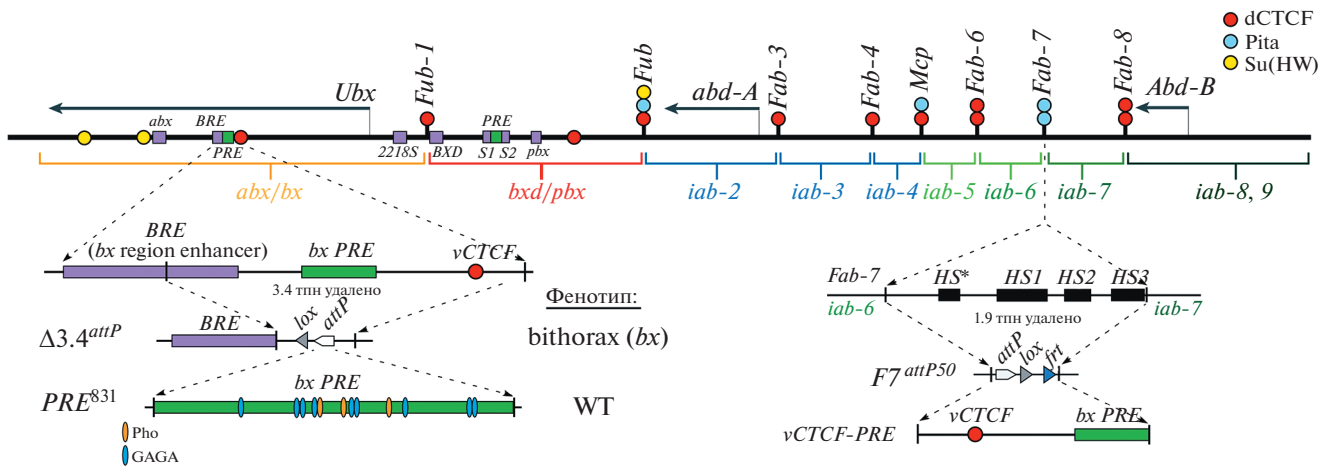


Рис. 1. Схема организации генов и регуляторных доменов в BX-C. Показаны *abx/bx*, *bxd/pbx* и *iab-2 – iab-8* домены, ответственные за регуляцию генов *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B* и за развитие парасегментов 5–13/сегментов T3–A8. Эмбриональные энхансеры *Ubx* представлены в виде фиолетовых прямоугольников. Поперечные линии с цветными кружками обозначают границы. Сайты связывания изоляторных белков dCTCF, Pita и Su(Hw) на границах обозначены красными, голубым и желтыми кружками. В нижней части рисунка изображены схемы регуляторного района, содержащего варибельный сайт dCTCF и границы *Fab-7*, а также их делеции. Для *Fab-7* сайты гиперчувствительности *HS**, *HS1*, *HS2*, *HS3* изображены как черные прямоугольники на линии координат. Сайт гиперчувствительности *bx PRE* изображен как зеленый прямоугольник, а сайты для белков Pho и GAGA-фактора как оранжевые и синие овалы. Сайты *attP*, *lox* и *ftr*, использованные для генетических манипуляций, обозначены как белые, серые и синие треугольники.

связывание dCTCF с *vCTCF* стимулирует тканеспецифичное взаимодействие энхансеров *abx* и *BRE* с промотором [9, 10]. Целью данной работы была проверка этой гипотезы.

Для изучения функции *vCTCF* сайта в энхансер-промоторных взаимодействиях с помощью метода CRISPR/Cas9 мы создали платформу $\Delta 3.4^{attP}$, в которой фрагмент размером 3408 пн (3R:16701239..16704646), включающий в себя *vCTCF* сайт и *bx PRE* (polycomb response element) (рис. 1), был удален и замещен сайтом *attP*. Мы показали, что делеция имеет слабый варибельный фенотип потери функции (loss-of-function, LOF). Этот фенотип имеет название *bithorax (bx)* и выражается в частичной трансформации T3 сегмента в T2 [11, 12]. Так, у полученных нами мух на третьей паре ног появляется щетинка, характерная для второй пары, также у них часто наблюдается увеличение A1 сегмента, а у ~10% мух между T3 и A1 сегментами образуется метанотальная ткань (рис. 2).

Данные трансформации объясняются нарушением взаимодействия энхансеров, находящихся ниже варибельного сайта dCTCF, с промотором *Ubx*. Полученная делеция $\Delta 3.4^{attP}$ перекрывается с описанной ранее делецией *bx^{34e-prv}* размером 9.5 тпн, которая так же имеет варибельный *bx* фенотип, вызванный уменьшением экспрессии *Ubx* в имгинальных дисках T3 сегмента [11].

Далее мы использовали описанную выше линию $\Delta 3.4^{attP}$ в качестве платформы для поиска минимального элемента, который бы спасал му-

тантный фенотип. Мы провели *attP-attB* зависимую интеграцию фрагмента *bx PRE* размером 831 пн (*PRE⁸³¹*, 3R:16702487..16703317) в линию $\Delta 3.4^{attP}$ и обнаружили, что он полностью восстанавливает *bx* фенотип до дикого типа. Это свидетельствует о том, что данный элемент способствует взаимодействию энхансеров с промотором *Ubx*, в то время как варибельный сайт dCTCF является избыточным.

Для того чтобы проверить, имеет ли варибельный сайт dCTCF инсуляторную активность, мы провели его интеграцию в платформу *Fab-7^{attP50}* (рис. 1). В данной платформе удалена граница *Fab-7*, в результате чего регуляторные домены *iab-6* и *iab-7* сливаются, и происходит преждевременная активация *iab-7*, что приводит к лизису шестого сегмента у самцов [13–15]. Ранее было показано, что PRE часто располагаются в непосредственной близости от изоляторов и вносят вклад в формирование функциональной границы [16, 17]. Поэтому для тестирования был использован фрагмент содержащего в себе *bx PRE* и варибельный сайт dCTCF в обратной ориентации — *vCTCF+PRE* (2161 п.н., 3R:16702487..16704647). У самцов полученной линии мух полностью отсутствовал шестой сегмент, что свидетельствует об отсутствии у *vCTCF+PRE* инсуляторной активности.

Таким образом, полученные данные не подтверждают модель, согласно которой *vCTCF* является необходимым медиатором энхансер-промоторных взаимодействий в домене *abx/bx*. Более

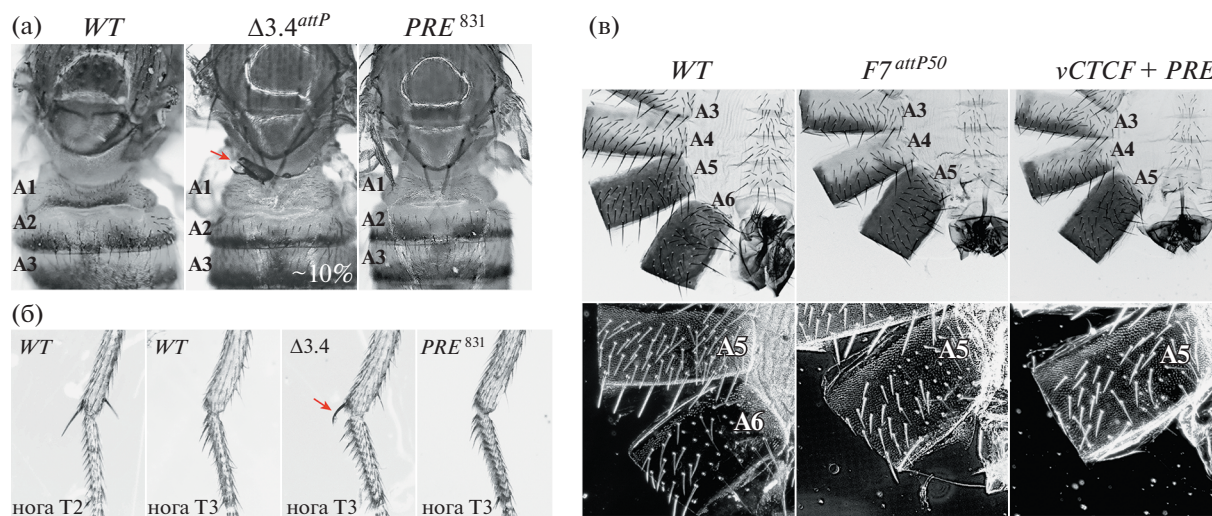


Рис. 2. (а) Сравнение фенотипов тергитов сегментов Т3–А1 мух дикого типа (*wt*), $\Delta 3.4^{attP}$ и PRE^{831} . $\Delta 3.4^{attP}$ имеет вариабельный фенотип, ~10% мух имеют увеличенный А1 сегмент. Красная стрелка указывает на очаг формирования мезанотальной ткани. Интеграция PRE^{831} восстанавливает мутантный фенотип до дикого типа. (б) Сравнение фенотипов ног Т3 сегмента мух *wt*, $\Delta 3.4^{attP}$ и PRE^{831} . У мух дикого типа на паре ног Т2 сегмента имеется пара длинных щетинок, которые отсутствуют на паре ног сегмента Т3. У мух линии $\Delta 3.4^{attP}$ на Т3 ноге развивается одна длинная щетинка (отмечена красной стрелкой), что свидетельствует о частичной трансформации в Т2. У мух PRE^{831} она не развивается. (в) Снимки кутикулы абдоминальных сегментов самцов линий *wt*, $Fab-7^{attP50}$, $vCTCF+PRE$ в светлом и темном поле. У самцов *wt* сегмент А7 отсутствует, стернит А6 изогнутый и лишен щетинок, а стернит А5 прямоугольный и покрыт щетинками. Тергит А5 полностью покрыт трихомами, а А6 покрыт ими только по переднему и вентральному краям (см. темное поле). У самцов $Fab-7^{attP50}$ из-за слияния регуляторных доменов *iab-6* и *iab-7* сегмент А6 трансформируется в А7 (не развивается). У самцов $vCTCF+PRE$ А6 сегмент так же не развивается.

того, данные указывают, что эту роль, вероятно, выполняет *bx PRE*. Дальнейшие исследования необходимы для изучения функции *bx PRE*. Поскольку потеря *bx PRE* приводит лишь к слабому фенотипу потери функции, можно предположить, что, в отличие от регуляторных доменов гена *Abd-B*, энхансеры *Ubx* гораздо более автономны и в меньшей степени зависят от других регуляторных элементов при формировании контакта с промотором.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантами Российского научного фонда. CRISPR/Cas9 мутагенез и *attP/attB* сайт-специфическая интеграция были выполнены при поддержке гранта 20-14-00201. Анализ фенотипов выполнен из средств гранта 19-74-30026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maeda R.K., Karch F. The open for business model of the bithorax complex in *Drosophila* // *Chromosoma*. V. 124. № 3. P. 293–307, Sep. 2015.
2. Özdemir I., Gambetta M.C. The Role of Insulation in Patterning Gene Expression // *Genes (Basel)*. 2019. V. 10. № 10. P. 767.
3. Valenzuela L., Kamakaka R.T. Chromatin Insulators // *Annual Review of Genetics*. 2006. V. 40. № 1. P. 107–138.
4. West A.G., Gaszner M., Felsenfeld G. Insulators: many functions, many mechanisms // *Genes Dev*. 2002. V. 16. № 3. P. 271–288.
5. Kyrchanova O. et al. The boundary paradox in the Bithorax complex // *Mechanisms of Development*. 2015. V. 138. P. 122–132.
6. Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. Selective interactions of boundaries with upstream region of *Abd-B* promoter in *Drosophila* bithorax complex and role of dCTCF in this process // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. № 8. P. 3042–3052.
7. Bowman S.K. et al. H3K27 modifications define segmental regulatory domains in the *Drosophila* bithorax complex // *eLife*. 2014. V. 3. P. e02833.
8. Magbanua J.P., Runneburger E., Russell S., White R. A Variably Occupied CTCF Binding Site in the Ultra-bithorax Gene in the *Drosophila* Bithorax Complex // *Mol Cell Biol*. 2015. V. 35. № 1. P. 318–330.
9. Qian S., Capovilla M., Pirrotta V. The *bx* region enhancer, a distant cis-control element of the *Drosophila* *Ubx* gene and its regulation by *hunchback* and other segmentation genes. // *EMBO J*. 1991. V. 10. № 6. P. 1415–1425.
10. Simon J., Peifer M., Bender W., O'Connor M. Regulatory elements of the bithorax complex that control expres-

- sion along the anterior-posterior axis // *EMBO J.* 1990. V. 9. № 12. P. 3945–3956.
11. *Peifer M., Bender W.* The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex. // *EMBO J.* 1986. V. 5. № 9. P. 2293–2303.
 12. *Bender W. et al.* Molecular Genetics of the Bithorax Complex in *Drosophila melanogaster* // *Science.* 1983. V. 221. № 4605. P. 23–29.
 13. *Hagstrom K., Muller M., Schedl P.* Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. // *Genes Dev.* 1996. V. 10. № 24. P. 3202–3215.
 14. *Mihaly J. et al.* Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex // *Cell Mol Life Sci.* 1998. V. 54. № 1. P. 60–70.
 15. *Mateo L.J., Murphy S.E., Hafner A., Cinquini I.S., Walker C.A., Boettiger A.N.* Visualizing DNA folding and RNA in embryos at single-cell resolution // *Nature.* 2019. V. 568. № 7750. P. 49–54.
 16. *Kyrchanova O. et al.* The insulator functions of the *Drosophila* polydactyl C2H2 zinc finger protein CTCF: Necessity versus sufficiency // *Sci Adv.* 2020. V. 6. № 13. P. eaaz3152.
 17. *Mihaly J., Hogga I., Gausz J., Gyurkovics H., Karch F.* In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element // *Development.* 1997. V. 124. № 9. P. 1809–1820.

THE VARIABLE CTCF SITE FROM *DROSOPHILA MELANOGASTER* *UBX* GENE IS REDUNDANT AND HAS NO INSULATOR ACTIVITY

A. N. Ibragimov^{a,#}, O. V. Bylino^a, O. V. Kyrchanova^a, Y. V. Shidlovskii^a, R. White^b, P. Schedl^c, and Academician of the RAS P. G. Georgiev^a

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

^b University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

^c Princeton University, Princeton, USA

#e-mail: airat.ibra@gmail.com

CTCF is the most thoroughly studied chromatin architectural protein and it is found in both *Drosophila* and mammals. CTCF preferentially binds to promoters and insulators and is thought to facilitate formation of chromatin loops. In a subset of sites, CTCF binding depends on the epigenetic status of the surrounding chromatin. One such variable CTCF site (*vCTCF*) was found in the intron of the *Ubx* gene, in close proximity to the *BRE* and *abx* enhancers. CTCF binds to the variable site in tissues where *Ubx* gene is active, suggesting that the *vCTCF* site plays a role in facilitating contacts between the *Ubx* promoter and its enhancers. Using CRISPR/Cas9 and *attP/attB* site-specific integration methods, we investigated the functional role of *vCTCF* and showed that it is not required for normal *Drosophila* development. Furthermore, a 2161-bp fragment containing *vCTCF* does not function as an effective insulator when substituted for the *Fab-7* boundary in the Bithorax complex. Our results suggest that *vCTCF* function is redundant in the regulation of *Ubx*.

Keywords: insulators, CTCF, Bithorax complex, *Ubx*

УДК 576.52:577.112

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *gapdh* В ОРГАНАХ МЫШЕЙ, НОКАУТНЫХ ПО ГЕНУ *insrr*

© 2022 г. Е. А. Ганцова^{1,*}, А. А. Гавриленкова^{1,2}, О. В. Серова¹, И. Е. Деев¹

Представлено академиком РАН А.Г. Габитовым

Поступило 15.04.2022 г.

После доработки 10.05.2022 г.

Принято к публикации 10.05.2022 г.

Важнейшим свойством живого организма является поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия и ионного состава внутренней среды. Почка является одним из основных органов, регулирующих рН в организме. Рецепторная тирозинкиназа IRR (рецептор, подобный рецептору инсулина) является сенсором щелочного рН. У мышей (*Mus Musculus*) с нокаутом гена *insrr*, кодирующего рецептор IRR, в условиях щелочной нагрузки наблюдается нарушение секреции бикарбоната, что свидетельствует о роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме. С целью поиска белков, функционально связанных с рецепторной тирозинкиназой IRR, нами было проведено широкомасштабное секвенирование транскриптомов почек мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, которых содержали в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. В результате мы обнаружили снижение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по гену *insrr*, в сравнении с мышами дикого типа. Данные РНК-секвенирования подтвердили методами TaqMan ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттинга. Используя метод TaqMan ПЦР в реальном времени, мы выявили снижение уровня экспрессии *gapdh* не только в почках, но и в печени и мозге мышей, нокаутных по гену *insrr*. Таким образом, изменение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи генов, и о возможной роли GAPDH в ранее не описанных молекулярных механизмах регуляции кислотно-основного баланса в организме.

Ключевые слова: *gapdh*, IRR, рецепторные тирозинкиназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

DOI: 10.31857/S2686738922040151

Одним из важнейших свойств живого организма является поддержание оптимального кислотно-щелочного равновесия и ионного состава внутренней среды, необходимого для жизнедеятельности клеток в условиях влияния внешних и внутренних факторов. Почка и легкие являются основными органами, регулируемыми рН в организме [1]. Почка регулирует кислотно-щелочное равновесие, увеличивая или снижая концентрацию ионов HCO_3^- и H^+ в жидкостях организ-

ма. Ключевую роль в этих процессах играют вставочные клетки собирательных трубочек почки. Так, α -вставочные клетки секретируют в мочу избыток кислоты и реабсорбируют бикарбонат в кровь, β -вставочные клетки секретируют бикарбонат и реабсорбируют кислоту.

Изучение регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме привело к открытию рН-чувствительных молекул, свойства и активность которых регулируется при изменении рН среды. Одним из сенсоров щелочного рН является рецептор, подобный рецептору инсулина (IRR), член семейства рецептора инсулина, которое также включает рецептор инсулина (IR) и рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) [2]. В отличие от своих близких гомологов рецепторов IR и IGF-IR, которые экспрессируются в широком спектре тканей и клеток, экспрессия IRR специфична, рецептор обнаруживается в некото-

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

² ФГАОБУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Россия

*e-mail: gantsova@mail.ru

рых органах, в определенных типах клеток. В почке IRR экспрессируется в β -вставочных клетках собирательных трубочек. У мышей с нокаутом по гену *insrr*, кодирующему рецептор IRR, в условиях щелочной нагрузки наблюдается нарушение секреции бикарбоната, а именно вывод его с мочой, что свидетельствует о роли рецепторной тирозинкиназы IRR в регуляции кислотно-щелочного равновесия в организме [3]. Также есть данные о том, что IRR экспрессируется в сердце и вместе с гомологами обеспечивает систему для стимуляции синтеза белка, обладает кардиопротекторными свойствами [4]. На данный момент молекулярные механизмы, лежащие в основе функционирования рецептора IRR, не известны. С целью поиска белков, функционально связанных с рецепторной тирозинкиназой IRR, нами было проведено широкомасштабное секвенирование транскриптома почек мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, которых содержали в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. Данные РНК-секвенирования подтверждали методами TaqMan ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттингом.

Мыши с нокаутом гена *insrr*^{-/-} были получены ранее на основе линии мышей C57Bl/6J. Для минимизации эффекта накопления мутаций был использован метод разведения мышей литтермейтсов, потомков одного поколения гетерозигот. В экспериментах использовали самок мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*^{-/-} одного возраста, 3–4 мес. Животных обоих генотипов (по 4 животных в каждой группе) содержали в двух условиях. При нормальных условиях мышей поили водой. В условиях щелочной нагрузки в течение 7 дней в воду для питья добавляли 280 мМ бикарбоната натрия. Показано, что при данных условиях у мышей или крыс развивается легкий метаболический алкалоз [5–7]. Для выравнивания метаболического статуса животных за 12 ч до извлечения органов у мышей забирали пищу, но оставляли питье. Перед выделением органов животных усыпляли с помощью анестезирующих препаратов, золетил 20 мг/кг массы тела, ксилазин 5 мг/кг массы тела в 0.9% растворе NaCl. Затем мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом комитета по уходу и использованию животных (IACUC, Institutional Animal Care and Use Committee), утвержденным Комиссией по биоэтике Института биоорганической химии им. Шемякина–Овчинникова РАН (ИБХ РАН).

Был проведен сравнительный анализ транскриптомов почек однопометных мышей дикого типа и мышей с нокаутом гена *insrr*, который кодирует рецепторную тирозинкиназу IRR, методом глубокого РНК-секвенирования. Для РНК-секвенирования вырезали сегмент почки толщи-

ной 3 мм из срединного отдела, помещали в буфер RNAlater и передавали для дальнейшего исследования в ЗАО “Геноаналитика” (Россия, Москва). Секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq 2500. Считывания RNA-Seq были сопоставлены с эталонным геномом мыши (mm10) с помощью STAR. Для количественной оценки уровней экспрессии всех аннотированных генов использовались считывания с уникальным картированием (Ensembl v.92). Количество общих генов было нормализовано до CPM (количество на миллион) с помощью EdgeR. Анализ дифференциальной экспрессии также выполняли с использованием EdgeR. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Software, USA). Данные, полученные для животных двух генотипов, соответствовали критерию нормальной выборки (критерий Шапиро–Уилка). Поэтому для расчета статистической значимости двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента, результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

В результате транскриптом содержал 13 430 генов, из которых при нокауте гена *insrr* в нормальных условиях достоверно изменяют свою дифференциальную экспрессию 2316 генов, из них 1348 генов с увеличенной экспрессией, 968 – с уменьшенной экспрессией. В условиях щелочной нагрузки достоверно изменили дифференциальную экспрессию 2879 генов, из них 1504 генов с увеличенной экспрессией и 1375 генов с пониженной экспрессией у мышей, нокаутных по *insrr*. Полученные данные были проанализированы с помощью базы данных PANTHER (pantherdb.org) для получения сведений о биологических процессах и сигнальных путях, в которые вовлечены гены с измененной экспрессией при нокауте гена *insrr*. Выявлены гены, связанные с сигнальным путем рецептора гонадолиберина, рецептора холецистокинина, а также гены цитокинов и белков клеточной адгезии. Гонадолиберин стимулирует развитие преимплантационных эмбрионов мыши, что представляет большой интерес, так как ранее нами было показано влияние рецепторной тирозинкиназы IRR на развитие преимплантационных эмбрионов мыши [8]. Среди биологических процессов обнаружены изменения экспрессии генов, участвующих в организации клеточных компонентов, генов-регуляторов, которые кодируют ДНК- и РНК-связывающие белки, факторы транскрипции и др. Выделили 1138 генов, вовлеченных в метаболические процессы клетки, среди которых множество генов, участвующих в синтезе метаболитов и связанных с энергетическими процессами в клетке.

По данным, полученным в результате РНК-секвенирования, мы наблюдали значительное сни-

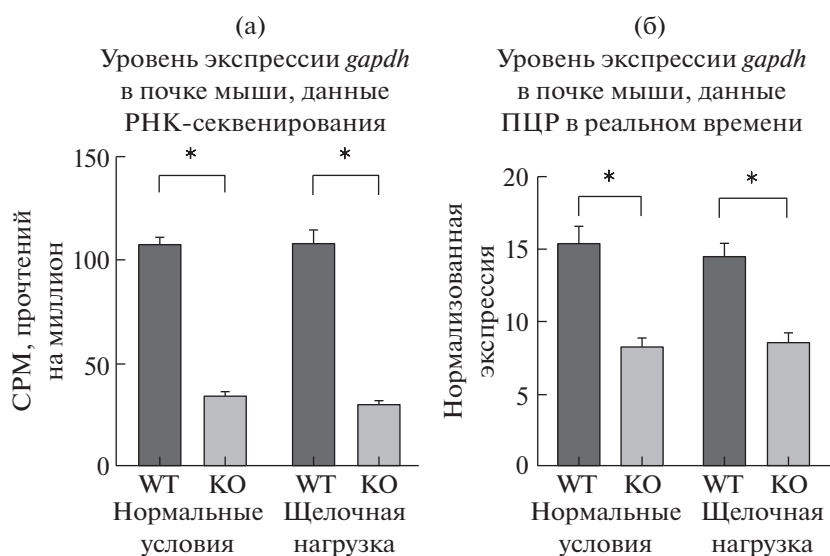


Рис. 1. а – Данные РНК-секвенирования почек мышей для гена *gapdh* (количество животных в каждой группе $n = 4$); б – результаты ПЦР в реальном времени для образцов кДНК из почек мыши для гена *gapdh* ($*p < 0.05$). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

жение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по гену *insrr* (рис. 1а).

Ген *gapdh* часто используется в качестве референсного гена при проведении ПЦР в реальном времени. Однако достоверная разница экспрессии *gapdh* в двух генотипах при разных условиях не позволяет использовать этот ген в качестве референсного при проведении ПЦР в реальном времени в случае мышей, нокаутных по гену *insrr*. При поиске референсных генов для ПЦР в реальном времени, с помощью литературных данных [9], были подобраны два гена, экспрессия которых по данным РНК-секвенирования не изменялась у животных разного генотипа при различных условиях – *Ap3d1* и *Csnk2a2*. *Ap3d1* – ген, кодирующий субъединицу адаптерного белка, участвующего в транспорте везикул в аппарате Гольджи. *Csnk2a2* – ген, кодирующий каталитическую субъединицу конститутивно активной серин/треонин-протеинкиназы. В ходе экспериментов были получены образцы РНК из почек мышей, которую использовали для синтеза

кДНК с помощью обратной транскриптазы. Полученную кДНК использовали как матрицу для ПЦР в реальном времени. Для каждого гена были подобраны специфичные праймеры и зонд с флуоресцентной меткой (см. табл. 1), синтезированные компаниями Lumiprobe и ЕвроГен (Москва, Россия), содержащие флуорофор FAM и тушитель VHQ1. Для дизайна праймеров использовали программы GeneRunner, OligoExplorer, OligoAnalyzer. Ген *Ap3d1* показал более высокий и стабильный уровень экспрессии и был выбран основным референсным геном для подсчета данных ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили на приборе DTrime фирмы ДНК-технология (Россия, Москва), для каждого образца кДНК в трех повторах. Нормализованную относительно референсного гена экспрессию рассчитывали по протоколу, описанному в [10].

По данным ПЦР в реальном времени экспрессия гена *gapdh* в почке мыши снижается на 54% ($p < 0.05$) при нокауте гена *insrr* (рис. 1б). В условиях щелочной нагрузки у нокаутных по *insrr* мы-

Таблица 1. Праймеры и зонды TaqMan для ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер от 5' к 3'	TaqMan зонд от 5' к 3'	Обратный праймер от 5' к 3'	Размер продукта, п.н.
<i>Ap3d1</i>	tcagtgcctctgaaagtcc	ctggaggagcagcggcgaca	agagagctgtggcgcc	139
<i>Csnk2a2</i>	cagagctcctgtggactatca	ctgcatgttagcgagcatgatattccgaa	acaagctggcatagtgtcc	129
<i>Gapdh</i>	ttgtcagcaatgcatcct	tggccaaggtcatccatgaca	ctgtggtcatgagccct	115

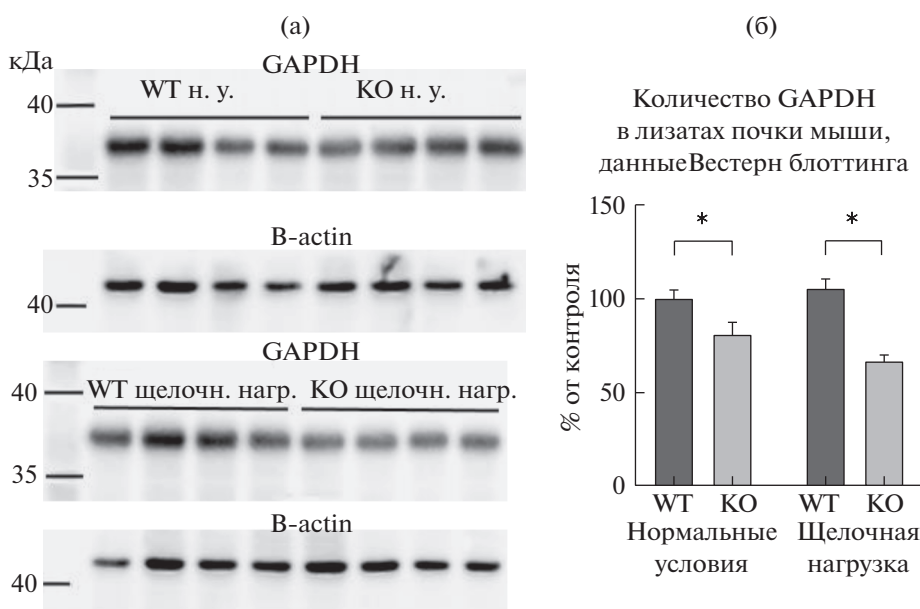


Рис. 2. а – Вестерн-блот анализ тотальных лизатов почек мышей. Слева указано положение белковых маркеров в геле, кДа, сверху указаны антитела, которыми производили окраску; б – количественный анализ экспрессии глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (количество животных в каждой группе $n = 4$, $*p < 0.05$). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

шей также наблюдалось снижение на 59% уровня экспрессии *gapdh* по сравнению с мышами дикого типа ($p < 0.05$). При этом в двух условиях уровни экспрессии гена *gapdh* оставались примерно одинаковыми и для животных дикого типа, и для нокаутных по *insrr*. Таким образом, можно предположить, что изменение экспрессии гена *gapdh* не связано с условиями экспериментального алкалоза.

Помимо анализа экспрессии мРНК, мы провели анализ экспрессии GAPDH на белковом уровне методом Вестерн блоттинга на образцах тотальных лизатов почек мышей дикого типа и нокаутных по гену *insrr*, содержащихся в нормальных условиях и в условиях щелочной нагрузки. В каждой группе было по 4 животных. Для получения белковых лизатов из животных извлекали почки, гомогенизировали в бездетергентном буфере на керамических шариках Lysing matrix D (MP Biomedicals) с использованием классической настольной системы для лизиса FastPrep-24 (MP Biomedicals), содержащем Tris-HCl 100 мМ, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma Aldrich), PMSF 1 мМ. Затем добавляли додецилсульфат натрия (SDS) до конечной концентрации 2%. Концентрацию белка определяли реагентом Coomassie Protein Assay kit (Sigma Aldrich) согласно протоколу производителя.

Белковые лизаты анализировали методом вестерн блоттинга с антителами anti-GAPDH 1:1000 (SC #25778), anti- β -actin 1:5000 (Cell Signaling

#3700). Для количественного анализа вестерн блоттинга использовали программу Fusion Solo (Vilber Lourmat). Сигналы на блотах анализировали денситометрией. В качестве контрольного белка использовали β -актин, экспрессия которого не меняется в почках мышей обоих генотипов в двух условиях по данным РНК-секвенирования. Определено отношение сигнала GAPDH к актину в каждом из образцов белковых лизатов почки. Отношение плотности сигнала пересчитали в процентах, где за 100% приняли среднее значение сигнала в лизатах почки животных дикого типа в нормальных условиях. По данным вестерн блоттинга (см. рис. 2) было выявлено снижение количества белка GAPDH в почках животных, нокаутных по гену *insrr* как при нормальных условиях (на 19%), так и в условиях щелочной нагрузки (на 39%, $p < 0.05$).

Ген *gapdh*, который относится к генам “домашнего хозяйства”, кодирует фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH). Эти гены являются конститутивными генами, которые необходимы для поддержания основных клеточных функций и стабильно экспрессируются во всех клетках организма при любых условиях и на всех стадиях развития [11]. Однако ранее были показаны различия в уровнях экспрессии мРНК *gapdh* между разными тканями. Ген *gapdh* экспрессируется во всех органах, наибольшее количество мРНК обнаруживается в тканях с активным энергопотреблением, в скелетных и сердеч-

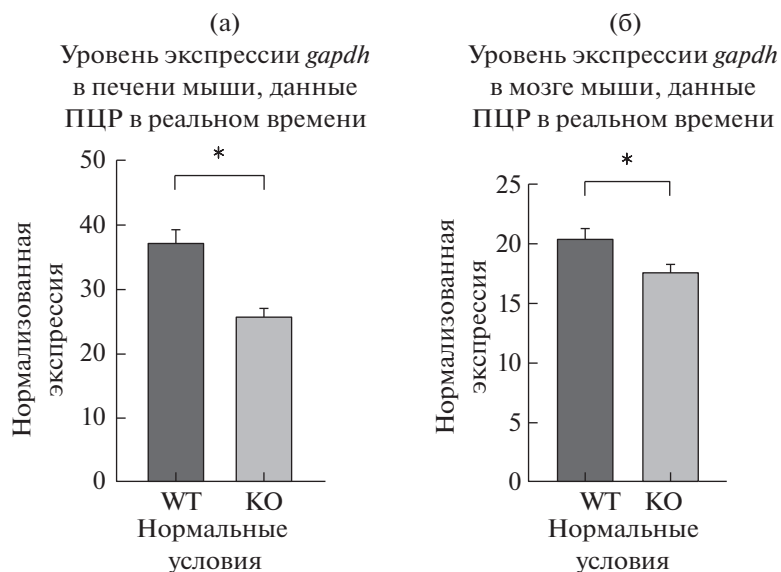


Рис. 3. а – Результаты ПЦР в реальном времени для образцов кДНК из печени мыши для гена *gapdh*, б – результаты ПЦР в реальном времени для образцов кДНК из печени мыши для гена *gapdh* (количество животных в каждой группе $n = 4$, $*p < 0.05$). Отрезками отмечены значения среднеквадратической ошибки (SEM). WT – мыши дикого типа, KO – мыши, нокаутные по гену *insrr*.

ной мышцах [12]. Уровень экспрессии мРНК GAPDH может меняться с возрастом и статусом питания, что было показано на модели цыплят на ранних сроках после вылупления [13]. Так же есть сведения, что уровень мРНК гена *gapdh* примерно одинаков для тканей почки, печени и мозга [14]. Далее мы провели исследования образцов кДНК из печени и мозга мыши методом TaqMan ПЦР в реальном времени, чтобы понять, характерно ли снижение экспрессии гена *gapdh*, наблюдаемое в почках, для других органов. Результаты показаны на рис. 3, где видно, что снижение экспрессии гена *gapdh* у нокаутных по *insrr* животных характерно также для печени (рис. 3а) и мозга (рис. 3б), все изменения достоверны ($p < 0.01$). Для печени и мозга показано снижение экспрессии гена *gapdh* на 30.5 и 13.7% соответственно.

GAPDH хорошо известен как один из ключевых ферментов, участвующих в гликолизе. Помимо своей роли в гликолизе GAPDH участвует во множестве внутриклеточных процессов, таких как апоптоз, транспорт железа, слияние мембран, регуляция транскрипции, транспорт везикул от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи, а также клеточная реакция на воздействия окружающей среды, например, при окислительном стрессе или гипоксии [15]. В почке млекопитающих показано, что GAPDH связан с хлоридно-бикарбонатным обменником AE1 (*slc4a1*), который отвечает за реабсорбцию бикарбоната в α -вставочных клетках собирательной трубочки. α -вставочные клетки почек отвечают

за выведение избытка кислот из организма и реабсорбцию бикарбоната в кровь, участвуя таким образом в поддержании кислотно-основного гомеостаза. Для C-конца белка AE1 в почке характерно связывание с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, которое обеспечивает его локализацию на мембране [16]. Исходя из этого, можно предположить участие GAPDH в регуляции кислотно-основного баланса в почке.

Показано, что GAPDH участвует во многих событиях, которые связаны с общим процессом передачи сигналов инсулина, включая сигнальные пути белков PI3K, Akt, Rab [14]. Интересно, что взаимодействие между GAPDH (т.е. фосфорилированной формой фермента) и фосфорилированным Akt в сердечной мышце крыс возникает при повышении глюкозы в крови [17]. Рецепторы инсулинового семейства, в том числе IIR, так же задействуют сигнальные пути, связанные с PI3K и Akt белками. Снижение уровня экспрессии белка GAPDH может приводить к изменению уровня метаболизма у мышей, нокаутных по гену *insrr*, о чем свидетельствуют и наши предыдущие исследования [18]. Ранее мы показали, что у мышей, несущих нокаут *insrr* $-/-$, наблюдаются поведенческие особенности в виде снижения агрессивно-оборонительного поведения [19], что может быть связано с изменением экспрессии ряда генов, в том числе *gapdh* в мозге нокаутных мышей.

Ген *gapdh* используется в качестве гена сравнения для ПЦР в реальном времени в большинстве

современных исследований. Полученные в ходе наших экспериментов данные не позволяют использовать этот ген как референсный для анализа экспрессии генов мышей, нокаутных по *insrr*. Для животной модели, используемой в эксперименте, нами был выбран ген *Ap3d1* в качестве референсного. В данной работе мы показали снижение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, методами РНК-секвенирования, ТаqМан ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттинга, как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Методом ТаqМан ПЦР в реальном времени мы выявили также снижение уровня экспрессии *gapdh* не только в почках, но и в печени и мозге мышей, нокаутных по *insrr*. Ранее нами было показано, что у мышей, нокаутных по гену *insrr*, при щелочной нагрузке на организм наблюдается пониженная секреция бикарбоната в моче [20]. При этом нокаут гена *insrr* приводит к снижению экспрессии $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменника SLC26A4, который локализуется в β -вставочных клетках почечных канальцев, участвующих в секреции ионов бикарбоната почками. Таким образом, изменение экспрессии гена *gapdh* в почках мышей, нокаутных по *insrr*, может свидетельствовать о функциональной взаимосвязи генов, и о возможной роли GAPDH в ранее не описанных молекулярных механизмах регуляции кислотно-основного баланса в организме.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 19-34-90177, 20-04-00880.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clayton-smith M. Renal physiology: acid e base balance // Anaesth Intensive Care Med. 2021. V. 22. P. 415–421.
2. Deyev I.E., Popova N.V., Serova O.V., et al. Alkaline pH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line // Biochimie. 2017. V. 138. P. 62–69.
3. Serova O.V., Gantsova E.A., Deyev I.E., et al. The Value of pH Sensors in Maintaining Homeostasis of the Nervous System // Russ J Bioorganic Chem. 2020. V. 46. P. 369–384.
4. Meijles D.N., Fuller S.J., Cull J.J., et al. The insulin receptor family and protein kinase B (Akt) are activated in the heart by alkaline pH and α 1-adrenergic receptors // Biochem J. 2021. V. 478. P. 2059–2079.
5. Eladari D., Leviel F., Pezy F., et al. Rat proximal NHE3 adapts to chronic acid-base disorders but not to chronic changes in dietary NaCl intake // Am J Physiol – Ren Physiol. 2002. V. 282. P. 835–843.
6. Sabolić I., Brown D., Gluck S.L., et al. Regulation of AE1 anion exchanger and H^+ -ATPase in rat cortex by acute metabolic acidosis and alkalosis // Kidney Int. 1997. V. 51. P. 125–137.
7. Wagner C.A., Finberg K.E., Stehberger P.A., et al. Regulation of the expression of the Cl^- /anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status // Kidney Int. 2002. V. 62. P. 2109–2117.
8. Ганцова Е.А., Деев И.Е., Петренко А.Г. и др. Анализ развития преимплантационных эмбрионов мыши, нокаутных по гену *insrr* // ОНТОГЕНЕЗ. 2022. Т. 53. С. 196–202.
9. Hildyard J.C.W., Finch A.M., Wells D.J. Identification of qPCR reference genes suitable for normalizing gene expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy // PLoS One. 2019. V. 14.
10. Серова О.В., Ганцова Е.А., Деев И.Е. и др. Тканеспецифическая экспрессия изоформ нейрексина-1 α в органах крысы // Биоорганическая химия. 2022. Т. 48. С. 217–222.
11. Wei K., Ma L. Concept development of housekeeping genes in the high-throughput sequencing era // Yi Chuan = Hered. 2017. V. 39. P. 127–134.
12. Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues // Physiol Genomics. 2005. V. 21. P. 389–395.
13. Mozdziak P.E., Dibner J.J., McCoy D.W. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Expression Varies With Age and Nutrition Status // Nutrition. 2003. V. 19. P. 438–440.
14. Seidler N.W. Basic biology of GAPDH // Adv Exp Med Biol. 2013. V. 985. P. 1–36.
15. Singh N., Bhalla N. Moonlighting Proteins // Annu. Rev. Genet. 2020. V. 54. P. 265–85.
16. Su Y., Blake-Palmer K.G., Fry A.C., et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is required for band 3 (anion exchanger 1) membrane residency in the mammalian kidney // Am J Physiol Renal Physiol. 2011. V. 300. P. F157–F166.
17. Baba T., Kobayashi H., Kawasaki H., et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with phosphorylated Akt resulting from increased blood glucose in rat cardiac muscle // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 2796–2800.
18. Деев И.Е., Ржевский Д.И., Берчатова А.А. и др. Декомпенсированный метаболический алкалоз у мышей с нокаутом гена *insrr* // Acta naturae. 2011. V. 4. P. 119–122.
19. Zubkov E.A., Morozova A.Y., Chachina N.A., et al. Behavioral Characteristics of Mice with Knockout of the IRR Alkali Sensor Gene // Neurosci Behav Physiol. 2018. V. 48. P. 483–487.
20. Deyev I.E., Sohet F., Vassilenko K.P., et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // Cell Metab. 2011. V. 13. P. 679–689.

CHANGES IN THE EXPRESSION OF THE *gapdh* GENE IN THE ORGANS OF *insrr* KNOCKOUT MICE

E. A. Gantsova^{a,#}, A. A. Gavrilenkova^{a,b}, O. V. Serova^a, and I. E. Deyev^a

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

^b The Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

The most important property of a living organism is the maintenance of optimal acid-base balance and the ionic composition of the internal environment. The kidneys are one of the main pH-regulating organs in the body. Receptor tyrosine kinase IRR (an insulin receptor-like receptor) is an alkaline pH-sensor. In mice (*Mus Musculus*) with a knockout of the *insrr* gene encoding the IRR receptor, under conditions of alkaline loading, a violation of bicarbonate secretion is observed, which indicates the role of the receptor tyrosine kinase IRR in the regulation of acid-base balance in the body. In order to search for proteins functionally associated with the receptor tyrosine kinase IRR, we performed a large-scale sequencing of the kidney transcriptome of wild-type and *insrr* knockout mice, which were kept under normal conditions and under alkaline conditions. As a result, we found a decrease in *gapdh* gene expression in the kidneys of *insrr* knockout mice compared to wild-type mice. RNA sequencing data were confirmed by TaqMan real-time PCR and Western blotting. Using the TaqMan real-time PCR method, we revealed a decrease in the level of *gapdh* expression not only in the kidneys, but also in the liver and brain of *insrr* knockout mice. Thus, changes in *gapdh* gene expression in the kidneys of *insrr* knockout mice may indicate a functional relationship between genes and a possible role of GAPDH in previously undescribed molecular mechanisms of regulation of acid-base balance in the body.

Keywords: *gapdh*, IRR, receptor tyrosine kinases, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase