



# ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ

[www.sciencejournals.ru](http://www.sciencejournals.ru)



# СОДЕРЖАНИЕ

Том 513, 2023

- Новый вид *Harpalodectes* (Harpalodectidae, Mesonychia) из палеоцена Монголии  
*А. В. Лопатин* 521
- Mustela strandi* (Mustelidae, Carnivora) из раннего плейстоцена Крыма  
*Д. О. Гимранов, Ц. Цзянцзуо, А. В. Лавров, А. В. Лопатин* 528
- Среднеголоценовый бурый медведь (*Ursus arctos*) с острова Большой Ляховский (Новосибирские острова)  
*М. Ю. Чепрасов, Г. Г. Боескоров, Г. П. Новгородов, А. Н. Тихонов, Л. В. Григорьева, Е. С. Булыгина, Н. В. Слободова, Ф. С. Шарко, А. В. Протопопов, А. В. Недолужко* 533
- Содержание изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  в коллагене костей географических, возрастных и половых групп уральского пещерного медведя (Mammalia, Carnivora, Ursidae, *Ursus (Spelaearctos) kanivetzi verestchagin, 1973*)  
*П. А. Косинцев, К. Ю. Коновалова, Г. В. Симонова* 539
- Уровень экспрессии генов инициации цветения (*CONZ1, GIGZ1a, GIGZ1b, FKF1a, FKF1b*) в проростках в условиях длинного дня различает ранне- и позднеспелые линии *Zea mays* L.  
*Д. Х. Архестова, О. К. Анисимова, Е. З. Кочиева, А. В. Щенникова* 544
- Состав жирных кислот общих липидов у пестряток и смолтов атлантического лосося *Salmo salar* L., выращенных в аквакультуре при разных режимах освещения  
*Д. С. Провоторов, С. А. Мурзина, В. П. Воронин, А. Е. Курицын, Н. Н. Немова* 549
- Морфофункциональные и молекулярные изменения в плаценте и периферической крови при преэклампсии и гестационном сахарном диабете  
*К. А. Артемьева, Ю. В. Степанова, И. И. Степанова, М. В. Шамаракова, Н. Б. Тихонова, Н. В. Низяева, С. Г. Цахилова, Л. М. Михалева* 555
- Осенняя миграция гигантской вечерницы (*Nyctalus lasiopterus*): через страны и горы к новому рекорду дальности сезонных перелетов летучих мышей  
*Д. А. Васеньков, Н. С. Васильев, Н. В. Сидорчук, В. В. Рожнов* 564
- Влияние обработки салициловой кислотой семян на активность карбоангидразы, скорость фотосинтеза, устьичную проводимость и содержание пигментов в листьях пшеницы при избытке цинка  
*А. А. Игнатенко, И. А. Нилова, Е. С. Холопцева, А. Ф. Титов, Н. М. Казнина* 570
- Синтетические пептидные фрагменты токсина WTX снижают артериальное давление у крыс в состоянии общей анестезии  
*М. С. Северюхина, А. М. Исмаилова, Э. Р. Шайхутдинова, И. А. Дьяченко, Н. С. Егорова, А. Н. Мурашев, В. И. Цетлин, Ю. Н. Уткин* 575

Уровень внутриклеточного монофосфата гемцитабина предсказывает эффективность химиотерапии с использованием гемцитабина у больных раком мочевого пузыря	
<i>М. Р. Янова, А. П. Жиянов, И. Д. Антипенко, С. А. Слободов, Е. В. Степанова</i>	581
Взаимодействие мРНК с С-концевым доменом PCID2, субъединицей комплекса TREX-2, необходимо для ее экспорта из ядра в цитоплазму у <i>Drosophila melanogaster</i>	
<i>Ю. А. Вдовина, С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова</i>	586
Ремоделирующий хроматин комплекс PBAF участвует в активации и репрессии генов воспаления	
<i>А. В. Феоктистов, С. Г. Георгиева, Н. В. Сошникова</i>	590
Белки СВР и RAD21 связываются на границах форум-доменов в хромосомах человека	
<i>Н. А. Чуриков, И. Р. Алембеков, Е. С. Клушевская, П. Б. Мейлах, А. Н. Кретова, О. Д. Манагарова, Г. И. Кравацкая, Ю. В. Кравацкий</i>	595
Роль обыкновенного ужа <i>Natrix natrix</i> (reptilia, colubridae) в переносе полиненасыщенных жирных кислот из водных экосистем на сушу	
<i>Ю. Ю. Дгебуадзе, Л. А. Неймарк, И. В. Башинский, Н. Н. Сущик, А. Е. Рудченко, М. И. Гладышев</i>	599
TREX-2 комплекс человека взаимодействует с субъединицами ORC комплекса	
<i>М. М. Кушакова, С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова</i>	604

---

---

# CONTENTS

---

---

Vol. 513, 2023

---

---

- A new species of *Hapalodectes* (Hapalodectidae, Mesonychia) from the Paleocene of Mongolia  
*A. V. Lopatin* 521
- Mustela strandi* (Mustelidae, Carnivora) from the Early Pleistocene of Crimea  
*D. O. Gimranov, Q. Jiangzuo, A. V. Lavrov, and A. V. Lopatin* 528
- Middle Holocene Brown Bear (*Ursus Arctos*) from Bolshoy Lyakhovsky Island (New Siberian Islands)  
*M. Yu. Cheprasov, G. G. Boeskorov, G. P. Novgorodov, A. N. Tikhonov, L. V. Grigoriev, E. S. Boulygina, N. V. Slobodova, F. S. Sharko, A. V. Protopopov, and A. V. Nedoluzhko* 533
- Content of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N Isotops in Bone Collagen of Geographical, Age And Sex Groups of the Ural Cave Bear (Mammalia, Carnivora, Ursidae, *Ursus (Spelaearctos)* Kanivetz Verestchagin, 1973)  
*P. A. Kosintsev, K. Yu. Konovalova, and G. V. Simonova* 539
- Expression Level of Flowering Time Genes (*CONZI, GIGZIA, GIGZIB, FKFI A, FKFI B*) in Seedlings Under Long Day Conditions Differentiates Early and Late *Zea mays* L.  
*D. Kh. Arkhestova, O. K. Anisimova, E. Z. Kochieva, and A. V. Shchennikova* 544
- Composition of Fatty Acids of the Total Lipids in Parr and Smolts of Atlantic Salmon *Salmo salar* L. Reared under Different Lighting Modes in Aquaculture  
*D. S. Provotorov, S. A. Murzina, V. P. Voronin, A. E. Kuritsyn, and N. N. Nemova* 549
- Morphofunctional and Molecular Changes in Placenta and Peripheral Blood in Preeclampsia and Gestational Diabetes Mellitus  
*K. A. Artemieva, Yu. V. Stepanova, I. I. Stepanova, M. V. Shamarakova, N. B. Tikhonova, N. V. Nizyaeva, S. G. Tsakhilova, and L. M. Mikhaleva* 555
- Autumn Migration of the Greater Noctule Bat (*Nyctalus Lasipterus*): Across Countries and Mountains to a New Record for the Range of Seasonal Flights of Bats  
*D. A. Vasenkov, N. S. Vasiliev, N. V. Sidorchuk, and V. V. Rozhnov* 564
- Influence of Seed Treatment with Salicylic Acid on the Carbonic Anhydrase Activity, Photosynthesis Rate, Stomatal Conductance and Pigments Content in Wheat Leaves at Zinc Excess  
*A. A. Ignatenko, I. A. Nilova, E. S. Kholoptseva, A. F. Titov, and N. M. Kaznina* 570
- Synthetic Peptide Fragments of the Toxin WTX Reduce Blood Pressure in Rats Under General Anesthesia  
*M. S. Severyukhina, A. M. Ismailova, E. R. Shaykhutdinova, I. A. Dyachenko, N. S. Egorova, A. N. Murashev, V. I. Tsetlin, and Yu. N. Utkin* 575
- Intracellular Gemcitabine Monophosphate Levels Predict Chemotherapy Efficacy in Gemcitabine-Treated Patients with Bladder Cancer  
*M. R. Yanova, A. P. Zhiyanov, I. D. Antipenko, S. A. Slobodov, and E. V. Stepanova* 581

Interaction of mRNA with the C-terminal DOMAIN of PCID2, a subunit of the TREX-2 complex, is Required for its Export from the Nucleus to the Cytoplasm in <i>Drosophila melanogaster</i>	586
<i>Y. A. Vdovina, S. G. Georgieva, and D. V. Kopytova</i>	
Chromatin Remodeling complex PBAF Activates and Represses Inflammatory Genes	590
<i>A. V. Feoktistov, S. G. Georgieva, and N. V. Soshnikova</i>	
CBP and RAD21 Bind at the Termini of Forum Domains in Human Chromosomes	595
<i>N. A. Tchurikov, I. R. Alembekov, E. S. Klushevskaya, P. B. Meilakh, A. N. Kretova, O. D. Managrova, G. I. Kravatskaya, and Y. V. Kravatsky</i>	
The role of the Grass Snake Natrix <i>Natrix</i> (Reptilia, Colubridae) in the Transfer of Polyunsaturated Fatty Acids from Aquatic to Terrestrial Ecosystems to Land	599
<i>Yu. Yu. Dgebuadze, L. A. Neymark, I. W. Bashinskiy, N. N. Sushchik, A. E. Rudchenko, and M. I. Gladyshev</i>	
The Human Trex-2 Complex Interacts with Subunits of the ORC Complex.	604
<i>M. M. Kurshakova, S. G. Georgieva, and D. V. Kopytova</i>	

---

---

УДК 569.7:551.781.33(517)

## НОВЫЙ ВИД *HAPALODECTES* (HAPALODECTIDAE, MESONYCHIA) ИЗ ПАЛЕОЦЕНА МОНГОЛИИ

© 2023 г. Академик РАН А. В. Лопатин<sup>1,\*</sup>

Поступило 12.07.2023 г.  
После доработки 29.07.2023 г.  
Принято к публикации 31.07.2023 г.

Из местонахождения Цаган-Хушу в Монголии (верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден) по фрагменту нижнечелюстной кости с  $M_2$ – $M_3$  описан *Hapalodectes paradux* sp. nov. (Hapalodectidae, Mesonychia).  $M_2$  и  $M_3$  приблизительно одинаковых размеров, с высоким протоконидом, смещенным вперед редуцированным метаконидом, антеролингвально направленным протокристом, очень глубокой задней вырезкой, узким талонидом, отчетливыми гипоконидом, энтоконидом и гипоконулидом. На основании зубных признаков новый вид предположительно относится к базальной части линии *Hapalodectes*, в начале эоцена распространившейся в Северную Америку. Цаган-Хушу – единственное известное местонахождение с двумя видами *Hapalodectes* (более крупным *H. dux* Lopatin, 2001 и более мелким *H. paradux* sp. nov.).

**Ключевые слова:** гапалодектиды, мезонихии, поздний палеоцен, Монголия, нижние моляры, рецессия пульпы, эволюция *Hapalodectes*, сосуществование видов

DOI: 10.31857/S2686738923600504, EDN: YAWUNX

Верхнепалеоценовая пачка жигден свиты наран-булак местонахождения Цаган-Хушу в южной Монголии содержит богатый комплекс остатков млекопитающих [1, 2]. При этом находки представителей некоторых групп единичны. К числу таких групп относятся гапалодектиды – мелкие мезонихии с ярко выраженными хищническими адаптациями в строении зубов. Описанный из Цаган-Хушу *Hapalodectes dux* Lopatin, 2001 основан только на голотипе – нижней челюсти с обоими рядами зубов [3, 4]. *H. dux* был описан как древнейший представитель рода (фаунистический комплекс пачки жигден датируется поздним палеоценом – гашатием) [1, 2]; в настоящее время из Китая известны еще два палеоценовых вида *Hapalodectes* – *H. lopatini* Solé et al., 2017 (средний палеоцен, ноншаний, интервал-зона *Bothriostylops*) и *H. paleocenus* Beard et al., 2010 (поздний палеоцен, гашатий) [5, 6]. В раннем эоцене (бумбании) на территории Китая обитали *H. hetangensis* Ting et Li, 1987 (интервал-зона *Orientalophus*) и *H. huanghaiensis* Tong et Wang, 2006 (интервал-зона *Homogalax*), в среднем эоцене (ирдынмангии) – *H. serus* Matthew et Granger, 1925 [7–11]. Из нижнего эоцена (уосача) Северной Америки (США)

описаны *H. anthracinus* Zhou et Gingerich, 1991 (зона Wa-1) и *H. leptognathus* (Osborn et Wortman, 1892) (= *H. compressus* Matthew, 1909; зоны Wa-4–Wa-7) [12–16].

Ниже приведено описание новой находки *Hapalodectes* в пачке жигден свиты наран-булак местонахождения Цаган-Хушу (сборы Южно-Гобийского отряда Совместной советско-монгольской палеонтологической экспедиции под руководством В.Ю. Решетова, 1987 г.). Экземпляр отнесен к новому виду, который характеризуется мелкими размерами и комбинацией примитивных и продвинутых морфологических признаков нижних коренных зубов.

Изученный материал хранится в Палеонтологическом институте им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве. Иллюстрации подготовлены при помощи цифрового фотоаппарата Nikon D800 с объективом AF-S Micro NIKKOR 60mm f/2.8G ED и рентгеновского микротомографа Neoscan N80 в ПИН. Параметры сканирования экз. ПИН, № 3104/775: 84 кВ, 48 мкА, размер пикселя 5.5 мкм, поворот на 180° с шагом 0.2°, фильтр Cu 0.1 мм. Параметры сканирования экз. ПИН, № 3104/371: 101 кВ, 159 мкА, размер пикселя 20 мкм, поворот на 180° с шагом 0.2°, фильтр Cu 0.5 мм. Рентгенографические изображения (2800 × 2400 пикселей) обработаны с использованием программного обеспечения Neoscan. Визуа-

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

\*e-mail: alop@paleo.ru

лизация 3D моделей с помощью CTvox (Bruker microCT).

Отряд Mesonychia Matthew, 1937

Семейство Hapalodectidae Szalay et Gould, 1966

Род *Hapalodectes* Matthew, 1909

*Hapalodectes paradux* Lopatin, sp. nov.

Название вида от пара, древнегреч. — около, и видового названия *Hapalodectes dux*.

Голотип — ПИН, № 3104/775, фрагмент правой нижнечелюстной кости с  $M_2$ – $M_3$ ; Монголия, Южная Гоби, Нэмэгэтинская впадина, Цаган-Хушу; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден.

Описание (рис. 1, 2, 3б, 4б). Размеры мелкие для рода. Нижние моляры секториальные, сильно сжатые поперечно.  $M_2$  и  $M_3$  имеют приблизительно одинаковые размеры и сходное строение (рис. 1). Параконид вдвое ниже протокониды. В основании параконида имеются два отчетливых дополнительных бугорка (антеролабиальный и антеролингвальный), ограничивающие переднюю входящую бороздку и вместе с ней обеспечивающие крепкое межзубное сцепление с талонидом предыдущего по положению зуба. Протоконидно-метаконидная доля отделена от параконида и талонида глубокими вырезками; особенно мощно развита широкая и очень глубокая задняя вырезка. Протоконид крупный и высокий, сильно сжат поперечно, с лабиальной стороны имеет характерные ланцетовидные очертания. Режущие лезвия протокониды (препротокристин и постпротокристин) мощные, угол между ними в вертикальной плоскости близок к прямому (около  $95^\circ$  на  $M_2$ ,  $100^\circ$  на  $M_3$ ). Метаконид большей частью слит с протоконидом, редуцированный, но отчетливо выраженный. Постеролингвальная сторона протоконидно-метаконидной доли без явной выемки, выделяющей метаконид дистально. Протокристин направлен антеролингвально. Талонид сравнительно узкий, существенно уступает по ширине тригониду. Мощный режущий гребень талонида посередине разделяется выступающей вершиной гипоконида. Редуцированный гипоконулид расположен заметно ниже гипоконида на заднем конце режущего гребня талонида. Рудиментарный энтоконид имеет вид миниатюрного базального бугорка в постеролингвальной части коронки, на  $M_2$  расположен ближе к основанию коронки и немного крупнее, чем на  $M_3$ . Задний край талонида  $M_2$  скошен постеродорсально, у  $M_3$  — вертикальный (боковой вид).

На  $M_2$  редуцированный метаконид с отчетливой самостоятельной вершиной, которая сильно смещена вперед по отношению к вершине протокониды и поэтому хорошо заметна даже с лабиальной стороны (рис. 1а, 1г, 3б). Вершины протокониды и метаконида соединены четким удлиненным прото-

кристиндом, сильно скошенным вперед. Угол между протокристиндом и препротокристиндом в горизонтальной плоскости (протокристиндный угол) составляет около  $40^\circ$  (рис. 1д, 4б). Параконид по массивности равен метакониду. Талонид расширяется дистально и имеет прямой задний край.

На  $M_3$  рудиментарный метаконид апикально гребневидный, не имеет выраженной собственной вершины, однако лингвальная выпуклость метаконида и протокристинд хорошо развиты. Протокристиндный угол около  $30^\circ$ . По ширине параконида и области дополнительных бугорков  $M_3$  заметно превосходит  $M_2$ . Талонид существенно сужается и закругляется дистально; он вытянут продольно сильнее, чем на  $M_2$ . Задний корень  $M_3$  в основании сильно расширен продольно.

Внутреннее строение зубов характеризуется значительным утолщением дентина в апикальной части протоконидно-метаконидной доли, в основании задней вырезки и в области гипоконида (рис. 2а). На  $M_2$  фиксируется сильное сужение пульпарной полости (рецессия пульпы) в области тригониды за счет визуально отчетливо обособленного внутреннего слоя дентина (рис. 2б, 2в); оно может быть связано с аномально усиленным формированием вторичного дентина.

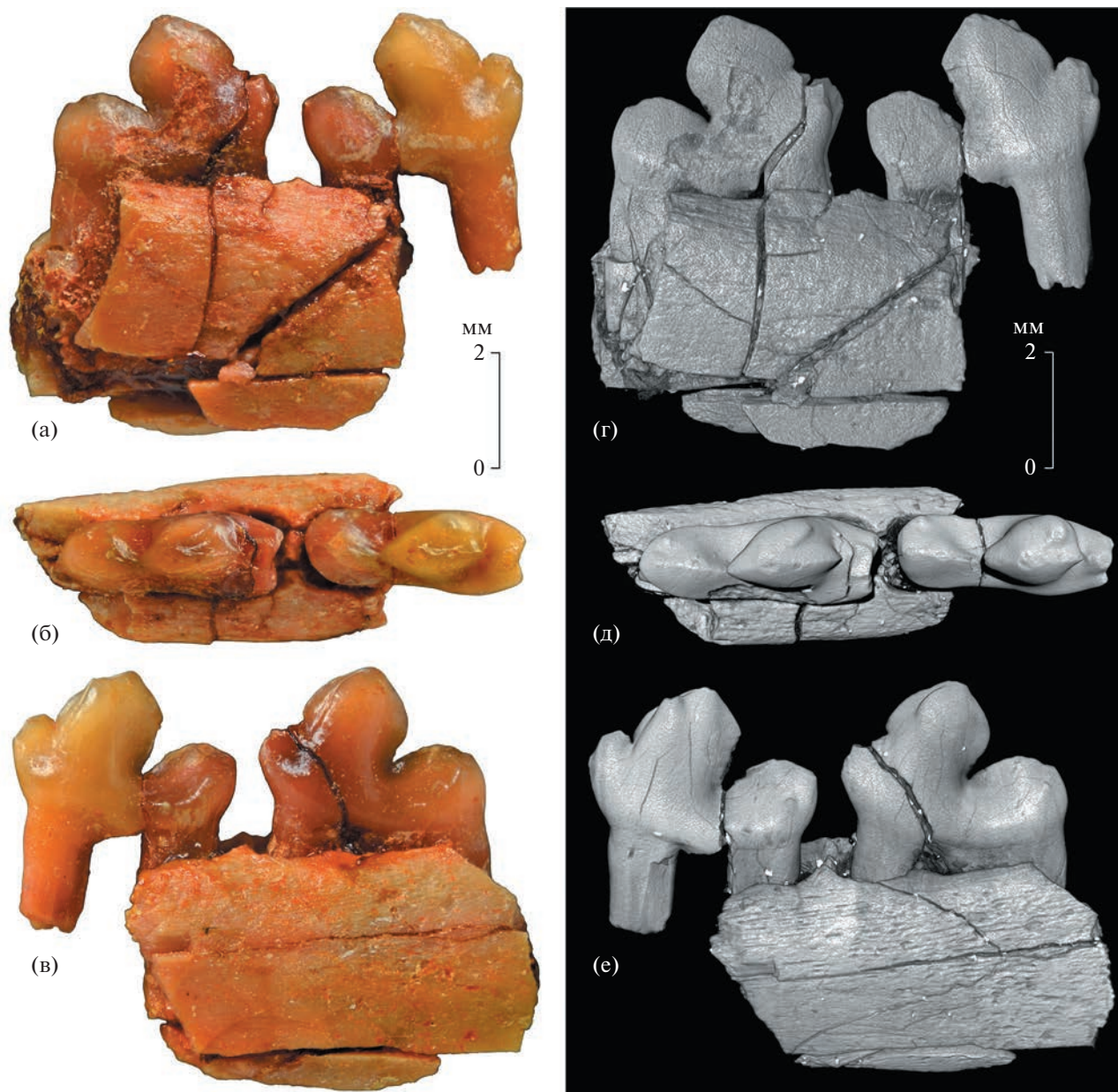
Размеры голотипа в мм.  $M_2$ : длина — 3.85, ширина тригониды — 1.45, ширина талонида — 1.35, высота по протокониду — 2.7;  $M_3$ : длина — 3.95, ширина тригониды — 1.5, ширина талонида — 1.3, высота по протокониду — 2.8.

Сравнение. *Hapalodectes paradux* sp. nov. заметно крупнее *H. hetangensis*, но существенно мельче всех прочих описанных видов рода (табл. 1).

Новый вид отличается от одновозрастного *H. dux* более мелкими размерами (рис. 3) и рядом признаков  $M_2$ – $M_3$  (рис. 4): сильно сдвинутым вперед редуцированным метаконидом (с гребневидной вершиной на  $M_3$ ), длинным протокристиндом и меньшим протокристиндным углом ( $40^\circ$  на  $M_2$ ,  $30^\circ$  на  $M_3$ ; у *H. dux* этот угол равен приблизительно  $75^\circ$  на  $M_1$ ,  $65^\circ$  на  $M_2$  и  $60^\circ$  на  $M_3$ ), а также более глубокой задней вырезкой и узким талонидом (у *H. dux* талонид не уступает по ширине тригониду).

*H. paradux* sp. nov. отличается от *H. lopatini*, *H. paleocenus*, *H. anthracinus*, *H. leptognathus* и *H. hetangensis* приблизительно равной длиной  $M_2$  и  $M_3$  (у первых четырех видов  $M_3$  сильно увеличен, а у последнего — несколько уменьшен).

Наличие метаконида на молярах отличает новый вид от *H. anthracinus* и *H. serus*, более длинный протокристинд  $M_2$ – $M_3$  и гребневидная форма вершины метаконида  $M_3$  — от *H. paleocenus* и *H. leptognathus*, наличие энтокониды — от *H. huanghaiensis*



**Рис. 1.** *Hapalodectes paradux* Lopotin, sp. nov., голотип ПИН, № 3104/775, фрагмент правой нижнечелюстной кости с  $M_2$ – $M_3$ : а–в – фотографии, г–е – компьютерная модель; а, г – с лабиальной стороны; б, д – с окклюзиальной стороны; в, е – с лингвальной стороны; Монголия, Цаган-Хушу; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден.

и *H. serus*, его относительно слабая редукция – от *H. hetangensis*, *H. anthracinus* и *H. leptognathus*.

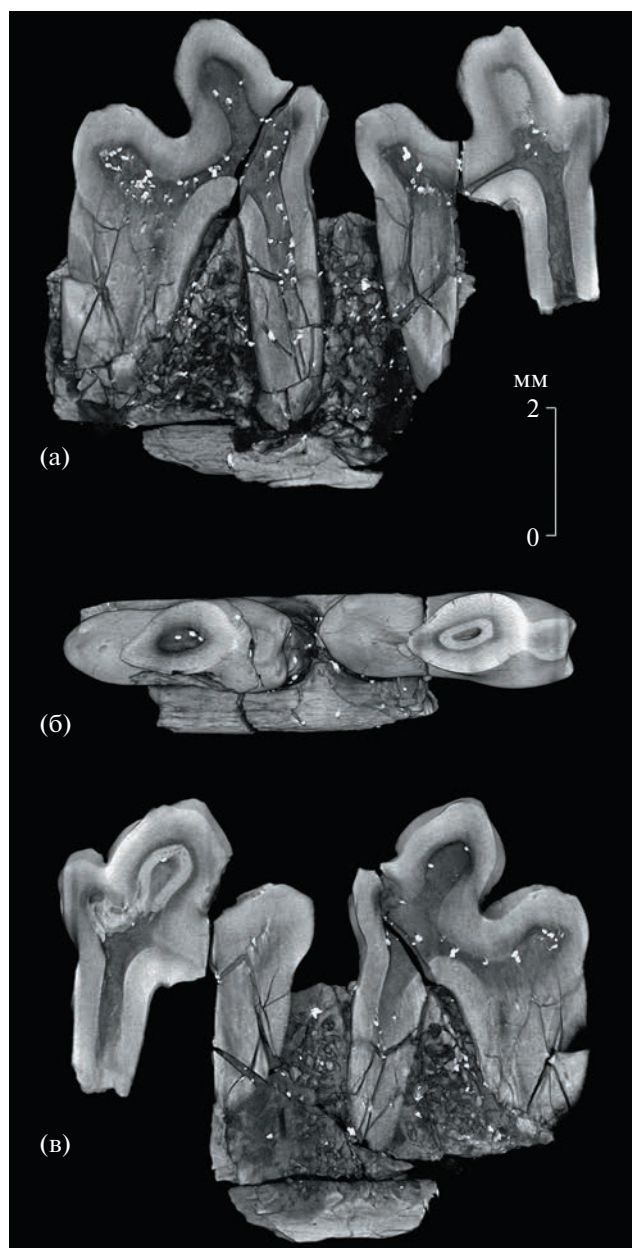
От видов, сохранивших на молярах сравнительно хорошо развитый метаконид (см. табл. 2), *H. paradux* sp. nov. отличается его большей редукцией, сильным передним смещением и, соответственно, более острым протокристинным углом, а также гребневидной вершиной этого бугорка на  $M_3$ .

**З а м е ч а н и я.** Находки гапалодектид довольно редки, а их разнообразие в каждом из местонахождений обычно ограничено одним видом. В

настоящее время Цаган-Хушу – единственное местонахождение, в котором совместно обнаружены два вида гапалодектов – сравнительно крупный *H. dux* и более мелкий *H. paradux* sp. nov.

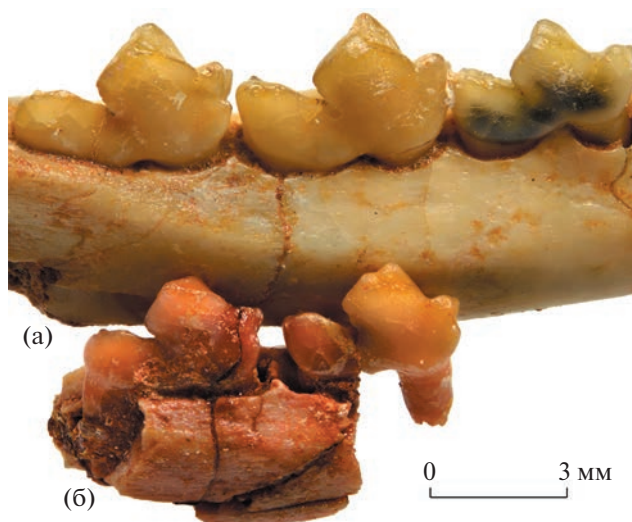
Голотипы *H. dux* и *H. paradux* sp. nov. сильно различаются размерами и строением зубов и поэтому не могут быть половыми, возрастными или иными внутривидовыми вариациями. Половой диморфизм у *Hapalodectes* предположительно отражается в высоте горизонтальной ветви нижней челюсти [6].





**Рис. 2.** *Hapalodectes paradux* Lopatin, sp. nov., голотип ПИН, № 3104/775, фрагмент правой нижнечелюстной кости с  $M_2$ – $M_3$ , компьютерная модель: а – сагиттальный срез с лабиальной стороны; б – фронтальный срез вентральнее вершин параконидов с окклюзиальной стороны; в – сагиттальный срез с лингвальной стороны; Монголия, Цаган-Хушу; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден.

Расчет по формуле С. Чжоу ( $Y = 1.327 \times X - 3.355$ , где  $X = \ln(L \times B)$  ( $L$  – длина  $M_2$ ,  $B$  – ширина  $M_2$ , мм),  $Y = \ln W$  (вес, кг)) [17] позволяет определить массу тела *H. paradux* sp. nov. в 360 г. Рассчитанная по этой формуле масса тела *H. leptognathus* – 700–1100 г (в среднем 900 г), *H. serus* – 870 г, *H. lopatini* – 740 г, *H. huanghaiensis* – 670 г, *H. anthracinus* – 530 г,



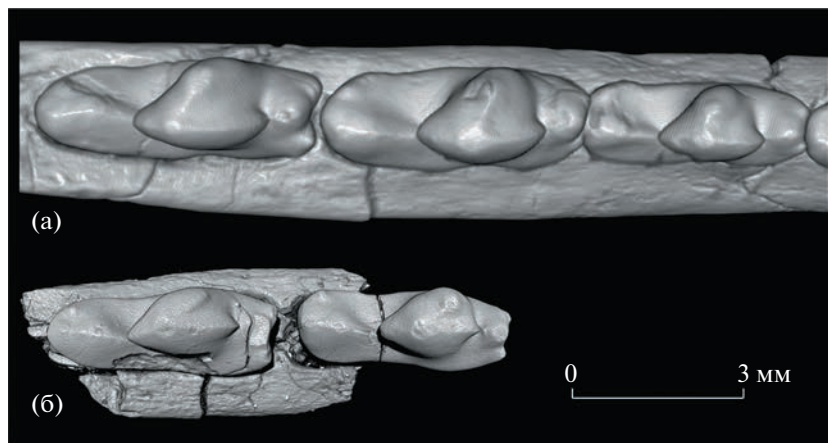
**Рис. 3.** Сравнение двух видов *Hapalodectes* из местонахождения Цаган-Хушу в Монголии: а – *H. dux* Lopatin, 2001, голотип ПИН, № 3104/371, нижняя челюсть, область правых  $M_1$ – $M_3$  с дорсолабиальной стороны; б – *H. paradux* Lopatin, sp. nov., голотип ПИН, № 3104/775, фрагмент правой нижнечелюстной кости с  $M_2$ – $M_3$  с дорсолабиальной стороны; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден.

*H. dux* – 500 г, *H. paleocenus* – 460 г, *H. hetangensis* – 190–200 г [3, 6, 17]. По размерам костей посткраниального скелета масса тела *H. leptognathus* оценивается в 1000–1500 г [18].

М а т е р и а л. Голотип.

Недавний филогенетический анализ мезонихий (*Mesonychia*, или *Acreodi*), архаичных хищных копытных палеогена Северного полушария, предполагает следующий порядок ветвления клад *Hapalodectes* ([6], рис. 3, majority-rule consensus tree): (*H. lopatini* + *H. dux*) ((*H. hetangensis* + *H. huanghaiensis*) (*H. paleocenus* (*H. leptognathus* (*H. anthracinus* + *H. serus*))). Этот эволюционный сценарий подразумевает базальное положение среднепалеоценового *H. lopatini* и позднепалеоценового *H. dux*, основанное на большом числе примитивных признаков, свойственных этим древним азиатским видам. Для их нижних моляров характерны хорошо обособленный метаконад, относительно крупные дополнительные бугорки впереди параконида, широкий талонид и четкие бугорки талонида – гипоконид, гипоконулид и энтоконид. Последний нижний моляр  $M_3$  приблизительно равен по длине  $M_2$  у *H. dux* и немного превосходит его у *H. lopatini*.

Эволюционно более продвинутые виды подразделяются на две основных кланды [3, 5, 6]. Первая из них включает раннеэоценовых *H. hetangensis* и *H. huanghaiensis* из Китая, вторая – позднепалеоце-



**Рис. 4.** Сравнение строения нижних моляров двух видов *Hapalodectes* из местонахождения Цаган-Хушу в Монголии, компьютерные модели с окклюзиальной стороны: а – *H. dux* Lopatin, 2001, голотип ПИН, № 3104/371, нижняя челюсть, область правых  $M_1$ – $M_3$ ; б – *H. paradox* Lopatin, sp. nov., голотип ПИН, № 3104/775, фрагмент правой нижней челюстной кости с  $M_2$ – $M_3$ ; верхний палеоцен, свита наран-булак, пачка жигден.

нового *H. paleocenus* из Китая, раннеоценовых *H. anthracinus* и *H. leptognathus* из Северной Америки и среднеоценового *H. serus* из Китая.

Близкое родство *H. hetangensis* и *H. huanghaiensis* поддерживается сходным строением верхних моляров, а также наличием хорошо обособленной вершины метаконида и относительно крупных дополнительных передних бугорков на нижних молярах [6]. Энтоконид рудиментарный у *H. hetangensis* и отсутствует у *H. huanghaiensis*, гипоконид и гипоконулид отчетливые.  $M_3$  равен по длине  $M_2$  у *H. huanghaiensis* и уступает ему у *H. hetangensis*.

Вторая клада характеризуется относительно крупными размерами, мелкими гребневидными дополнительными передними бугорками и прогрессивной редукцией метаконида и энтоконида вплоть до их полного исчезновения у *H. serus* (см. табл. 2). У представителей этой линии  $M_3$  по длине значительно превосходит  $M_2$  (неизвестно для

*H. serus*), а талониды сравнительно узкие, как и у *H. paradox* sp. nov. Отмеченная у *H. paradox* sp. nov. отчетливая редукция метаконида (особенно на  $M_3$ ) позволяет сближать новый вид с данной ветвью *Hapalodectes*. Эта редукция была связана с уменьшением ширины средней части нижних моляров (для усиления их режущего воздействия) и происходила путем слияния основания метаконида с протоконидом. Сужение протоконидно-метаконидной доли у *H. paradox* sp. nov. было достигнуто в том числе за счет переднего смещения вершины метаконида, которое уменьшило протокрестидный угол (как и у *H. leptognathus*, см. [13, 14]). Однако при этом новый вид сохранил некоторые примитивные для рода черты – относительно крупные дополнительные передние бугорки, наличие энтоконида и приблизительно одинаковую длину последнего и предпоследнего нижних моляров. По совокупности зубных признаков

**Таблица 1.** Сравнение длины  $M_2$  и  $M_3$  (средние значения в скобках, в мм) у *Hapalodectes* (данные для ранее известных видов по [3, 5, 6, 9, 11, 14–16])

Вид	$M_2$	$M_3$	$M_3/M_2$ , %
<i>H. lopatini</i>	4.89	>5.0	>102
<i>H. paleocenus</i>	4.2	4.7	111.9
<i>H. dux</i>	4.5	4.4–4.5 (4.45)	98–100 (99)
<i>H. paradox</i> sp. nov.	3.85	3.95	102.6
<i>H. hetangensis</i>	3.1–3.4 (3.25)	3.1	91–100 (95.4)
<i>H. huanghaiensis</i>	4.9	5.0	102
<i>H. serus</i>	5.51	–	–
<i>H. anthracinus</i>	4.7–4.88 (4.79)	–	>100
<i>H. leptognathus</i>	5.4–6.01 (5.71)	5.9–6.37 (6.07)	106–110 (106.3)

**Таблица 2.** Сравнение строения  $M_2$  и  $M_3$  у *Hapalodectes* (данные для ранее известных видов по [3, 5, 6, 9, 11, 14–16], протокристинный угол измерен по изображениям)

Вид	Метаконид	Протокристинный угол		Энтоконид
		$M_2$	$M_3$	
<i>H. lopatini</i>	развитый	55°	–	– (развитый на $M_1$ )
<i>H. paleocenus</i>	редуцированный	50°	45°	рудиментарный
<i>H. dux</i>	развитый	65°	60°	рудиментарный
<i>H. paradux</i> sp. nov.	редуцированный	40°	30°	рудиментарный
<i>H. hetangensis</i>	развитый	–	–	рудиментарный
<i>H. huanghaiensis</i>	развитый	60°	–	отсутствует
<i>H. serus</i>	отсутствует	отсутствует		отсутствует
<i>H. anthracinus</i>	отсутствует	отсутствует		рудиментарный
<i>H. leptognathus</i>	редуцированный	–	–	рудиментарный или отсутствует

*H. paradux* sp. nov. может рассматриваться как сестринский вид к *H. paleocenus*.

Итак, из палеоцена Азии теперь известны четыре вида *Hapalodectes* – *H. lopatini*, *H. dux*, *H. paleocenus* и *H. paradux* sp. nov., что подтверждает вывод о довольно разветвленной палеоценовой радиации этой группы [6]. Сценарий эволюции рода в эоцене включает следующие предположения. Линия *H. hetangensis* и *H. huanghaiensis*, эндемичная для юго-востока Китая, может быть связана происхождением с этим регионом, откуда также известен среднепалеоценовый *H. lopatini* [6]. В начале эоцена в Северную Америку проникли представители другой линии, давшие на новом континенте местную видовую радиацию (*H. anthracinus* и *H. leptognathus*). В основании данной линии могли быть сравнительно мелкие позднепалеоценовые *H. paleocenus* и *H. paradux* sp. nov., обитавшие в области Монгольского плато. В свою очередь, общий предок двух последних видов, очевидно, возник в результате более ранней палеоценовой радиации, давшей также *H. dux*. К еще более раннему этапу эволюции относится разделение предка всех обсуждаемых видов и *H. lopatini*.

Следует отметить особую роль области Монгольского плато в позднепалеоценовой радиации *Hapalodectes* [3, 6] в связи с существованием здесь в гашии трех видов этого рода – *H. paleocenus*, *H. dux* и *H. paradux* sp. nov., и совместным присутствием двух последних в местонахождении Цаган-Хушу. Видимо, значительные различия в строении коренных зубов и размерах тела у совместно существовавших видов *H. dux* и *H. paradux* sp. nov. способствовали минимизации трофической конкуренции между ними. Это соответствует представлениям о морфологической дивергенции зубной системы хищных млекопитающих как факторе симпатрического видообразования [19] и подчеркивает роль области Монгольского

плато как вероятного центра позднепалеоценовой диверсификации гапалодектид.

Предполагается, что в начале среднего эоцена представитель североамериканской линии гапалодектов мигрировал обратно в Азию, где дал начало *H. serus* [3, 5, 6]. Однако нельзя исключить, что *H. serus* возник в результате параллельного развития азиатской линии *Hapalodectes*, к среднему эоцену независимо достигшей такого же уровня специализации, что и североамериканский *H. anthracinus* в раннем эоцене [3]. В этой части эволюционный сценарий может быть существенно скорректирован и детализирован, когда в нижнем и среднем эоцене Азии будут найдены остатки эволюционно более продвинутых представителей линии *H. hetangensis* и *H. huanghaiensis* или других потомков палеоценовой радиации *Hapalodectes*.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен С.В. Багирову и Р.А. Ракизову (ПИН) за техническую помощь в подготовке иллюстраций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бадамгарав Д., Решетов В.Ю. Палеонтология и стратиграфия палеогена Заалтайской Гоби. М.: Наука, 1985 (Тр. ССМПЭ. Вып. 25).
2. Lopatin A.V. Early Paleogene insectivore mammals of Asia and establishment of the major groups of Insectivora // Paleontological Journal. 2006. V. 40. Suppl. 3. P. S205–S405.
3. Лопатин А.В. Древнейший *Hapalodectes* (Mesonychia, Mammalia) из палеоцена Монголии // Палеонтологический журнал. 2001. № 4. С. 90–96.
4. Лопатин А.В. Зубная аномалия у *Hapalodectes dux* (Hapalodectidae, Mesonychia) из позднего палеоце-

- на Монголии // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 512. С. 474–479.
5. *Beard K.C., Wang Y.-Q., Meng J. et al.* Paleocene *Hapalodectes* (Mammalia: Mesonychia) from Subeng, Nei Mongol: further evidence of “East of Eden” dispersal at the Paleocene-Eocene boundary // *Vertebrata Palasiatica*. 2010. V. 48. № 4. P. 375–389.
  6. *Solé F., De Bast E., Yang J. et al.* The first species of *Hapalodectes* (Mesonychia, Mammalia) from the middle Paleocene of China (Qianshan Basin, Anhui Province) sheds light on the initial radiation of hapalodectids // *Palaeontology*. 2017. V. 60. № 3. P. 433–449.
  7. *Matthew W.D., Granger W.* New mammals from the Ir-din Manha Eocene of Mongolia // *American Museum Novitates*. 1925. № 198. P. 1–10.
  8. *Szalay F.S., Gould S.J.* Asiatic Mesonychidae (Mammalia, Condylarthra) // *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1966. V. 132. Art. 2. P. 129–174.
  9. *Ting S., Li C.* The skull of *Hapalodectes* (?Acroedi, Mammalia), with notes on some Chinese Paleocene mesonychids // *Vertebrata Palasiatica*. 1987. V. 25. № 3. P. 161–186.
  10. *Ting S., Wang Y., Schiebout J.A. et al.* New Early Eocene mammalian fossils from the Hengyang Basin, Hunan China // *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History*. 2004. № 36. P. 291–301.
  11. *Tong Y., Wang J.* Fossil mammals from the Early Eocene Wutu Formation of Shandong Province // *Palaeontologia Sinica. New Ser. C*. 2006. № 28. P. 1–195.
  12. *Osborn H.F., Wortman J.L.* Fossil mammals of the Wahsatch and Wind River beds. Collection of 1891 // *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1892. V. 4. Art. 11. P. 81–147.
  13. *Matthew W.D.* The Carnivora and Insectivora of the Bridger Basin, Middle Eocene // *Memoirs of the American Museum of Natural History*. 1909. V. 9. Pt 6. P. 291–567.
  14. *Szalay F.S.* The Hapalodectinae and a phylogeny of the Mesonychidae (Mammalia, Condylarthra) // *American Museum Novitates*. 1969. № 2361. P. 1–26.
  15. *Zhou X., Gingerich P.D.* New species of *Hapalodectes* (Mammalia, Mesonychia) from the early Wasatchian, early Eocene, of northwestern Wyoming // *Contributions from the Museum of Paleontology, University of Michigan*. 1991. V. 28. № 9. P. 215–220.
  16. *O’Leary M.A., Rose K.D.* New mesonychian dentitions from the Paleocene and Eocene of the Bighorn Basin, Wyoming // *Annals of the Carnegie Museum*. 1995. V. 64. № 2. P. 147–172.
  17. *Gunnell G.F., Gingerich P.D.* New hapalodectid *Hapalolestes lovei* (Mammalia, Mesonychia) from the early Middle Eocene of northwestern Wyoming // *Contributions from the Museum of Paleontology, University of Michigan*. 1996. V. 29. № 15. P. 413–418.
  18. *Zhou X., Beard K.C.* Locomotor adaptations of *Hapalodectes* (Mammalia, Mesonychia) // *Journal of Vertebrate Paleontology*. 1993. V. 13. № 3. Suppl. P. 64.
  19. *Davies T.J., Meiri S., Barraclough T.G., Gittleman J.L.* Species co-existence and character divergence across carnivores // *Ecology Letters*. 2007. V. 10. № 2. P. 146–152.

## A NEW SPECIES OF *HAPALODECTES* (HAPALODECTIDAE, MESONYCHIA) FROM THE PALEOCENE OF MONGOLIA

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

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

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

*Hapalodectes paradox* sp. nov. (Hapalodectidae, Mesonychia) is described on the base of the dentary fragment with M<sub>2</sub>–M<sub>3</sub> from the Tsagan-Khushu locality in Mongolia (Upper Paleocene, Naran Bulak Formation, Zhigden Member). The M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> are approximately the same size, with a high protoconid, anteriorly displaced reduced metaconid, anterolingually directed protocristid, very deep posterior notch, narrow talonid, and distinct hypoconid, entoconid and hypoconulid. Based on dental characters, the new species is presumably related to the base of the lineage of *Hapalodectes* that dispersed to North America at the beginning of the Eocene. Tsagan-Khushu is the only known locality where two species of *Hapalodectes* co-occur (larger *H. dux* Lopatin, 2001 and smaller *H. paradox* sp. nov.).

**Keywords:** hapalodectids, mesonychians, Late Paleocene, Mongolia, lower molars, pulp recession, *Hapalodectes* evolution, species co-occurrence

УДК 569.742.4:551.793(477.75)

## MUSTELA STRANDI (MUSTELIDAE, CARNIVORA) ИЗ РАННЕГО ПЛЕЙСТОЦЕНА КРЫМА

© 2023 г. Д. О. Гимранов<sup>1,\*</sup>, Ц. Цзянцзуо<sup>2,3</sup>, А. В. Лавров<sup>4</sup>, академик РАН А. В. Лопатин<sup>4</sup>

Поступило 20.06.2023 г.  
После доработки 10.07.2023 г.  
Принято к публикации 12.07.2023 г.

Описана нижнечелюстная кость *Mustela strandi* Kormos, 1934 из нижнеплейстоценовых отложений (поздний виллафранк, 1.8–1.5 млн л.н.) пещеры Таврида в Крыму. Это первая находка в России *M. strandi* – вымершего вида куньих, известного по редким остаткам в нижнем и среднем плейстоцене Центральной Европы.

**Ключевые слова:** *Mustela strandi*, нижняя челюсть, поздний виллафранк, пещера Таврида, Крым

**DOI:** 10.31857/S2686738923600449, **EDN:** GTZZKA

Мелкие куньи рода *Mustela* появились в палеонтологической летописи в раннем плиоцене, причем их находки на протяжении всего плиоцена очень скудны. Самые древние виды *Mustela plioerminea* Stach, 1959 и *M. pliocaenica* Stach, 1959 описаны из местонахождений Венже 1 (Польша, 3.6–3.2 млн л.н.) и Вельферсхайм (Германия, 3.6–3.5 млн л.н.) [1, 2]. В плиоцене в пределах рода произошла дивергенция двух крупных линий – горностаев и ласок, что подтверждается молекулярно-генетическими данными [3].

В первой половине плейстоцена представители рода *Mustela* стали более многочисленными и распространились в Азию. Пика своего видового разнообразия род достиг, по-видимому, в позднем плейстоцене и голоцене, в современной фауне он представлен 17–18 видами [4].

Из нижнего плейстоцена Европы описаны *Mustela palerminea* (Petenyi, 1864), *M. praenivalis* Kormos, 1934, *M. strandi* Kormos, 1934, *M. putorius*

*stromeri* Kormos, 1934, *M. cf. eversmanii* (Lesson, 1827) и *M. nivalis* Linnaeus, 1766 [5–8]. В Азии отмечены *M. cf. sibirica* Pallas, 1773 [9] и *Mustela* sp. [10]. Самыми распространенными и многочисленными видами рода в раннем плейстоцене были *M. palerminea* и *M. praenivalis*, остатки которых найдены во многих европейских местонахождениях [11–13]. Недавно *M. palerminea* была обнаружена нами в Крыму [14].

Намного хуже известен весьма редкий европейский вид *M. strandi*. Впервые этот вид был обнаружен в Венгрии в местонахождении Брассо (средний плейстоцен), откуда он был описан как *Putorius (Arctogale)* sp. [15]. Впоследствии данная форма была выделена в самостоятельный вид *M. strandi* Kormos, 1934 [5]. Позднее *M. strandi* была определена еще из пяти центральноевропейских местонахождений. В раннем плейстоцене *M. strandi* обитала на территории Германии (Шернфельд, 1.9–1.6 млн л.н.) и Польши (пещера Жабья, 1.7–1.5 млн л.н.) [13]. На границе раннего и среднего плейстоцена остатки *M. strandi* обнаружены в этих же странах (пещера Сакдиллинг, Германия, 0.9–0.7 млн л.н.; Кози Гжбет, Польша, 0.8–0.7 млн л.н.) [13]. Серединой среднего плейстоцена датирована находка *M. strandi* в пещере Полудневой (Południowa Cave, Kitzelhöhle) на юго-западе Польши [16].

В настоящей статье нами рассматривается находка *M. strandi* в нижнем плейстоцене пещеры Таврида в Крыму (Белогорский район, п. Зуя). По составу фауны позвоночных основной костеносный слой пещеры Таврида датируется ранним плейстоценом (поздний виллафранк, псекупский фаунистический комплекс, около 1.8–1.5 млн л.н.) [17]. Среди млекопитающих отсюда определены

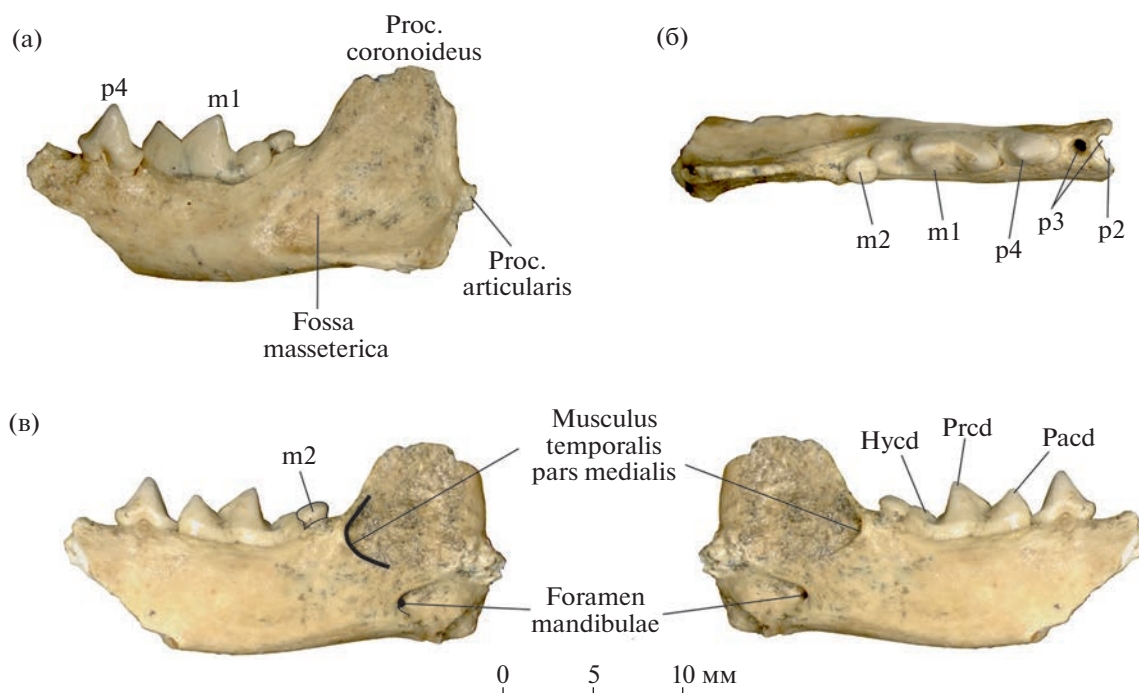
<sup>1</sup>Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup>Ключевая лаборатория орогенных поясов и эволюции земной коры, Школа наук о Земле и космосе, Пекинский университет, Пекин, Китай

<sup>3</sup>Ключевая лаборатория эволюции позвоночных и происхождения человека Китайской академии наук, Институт палеонтологии позвоночных и палеоантропологии Китайской академии наук, Пекин, Китай

<sup>4</sup>Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: djulfa250@rambler.ru



**Рис. 1.** *Mustela strandi* Kormos, 1934, экз. ИЭРЖ, № 727/2263, левая нижнечелюстная кость с р4–m2: а – с буккальной стороны, б – с окклюзиальной стороны, в – с лингвальной стороны (с прорисовкой зеркально); Крым, пещера Таврида; нижний плейстоцен. Обозначения: Hуcd – гипоконид, Pacd – параконид, Prcd – протоконид.

многочисленные крупные хищные семейств Ursidae, Canidae, Felidae и Nyuенidae и редкие мелкие Mustelidae [14].

Нами был дополнительно изучен голотип *M. strandi*, хранящийся в Геологическом музее Будапешта (Венгрия). Для сравнения использовались коллекции современных *M. erminea* Linnaeus, 1758, *M. nivalis* Linnaeus, 1766, *M. eversmannii* (Lesson, 1827), *M. putorius* Linnaeus, 1758, *M. sibirica* Pallas, 1773, *M. altaica* Pallas, 1811, *M. lutreola* Linnaeus, 1761 и *Neogale vison* (Schreber, 1777), хранящиеся в Институте экологии растений и животных УрО РАН (ИЭРЖ, Екатеринбург), Зоологическом музее Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и Зоологическом институте РАН (Санкт-Петербург).

Описываемый материал из пещеры Таврида представлен левой нижнечелюстной костью (экз. ИЭРЖ, № 727/2263, сборы 2021 г.). Измерения проводились штангенциркулем с точностью до 0.01 мм. Визуализация данных была выполнена в программе R 4.1 [18] с помощью пакета ggplot2 [19].

Левая ветвь нижней челюсти (экз. ИЭРЖ, № 727/2263) содержит нестертые р4–m2; резцовая часть челюсти, клык и симфиз утрачены, челюсть обломана на уровне р3. Вершина венечного отростка отсутствует, сочленовный и угловой отростки большей частью утрачены (рис. 1). Челюсть довольно массивная, массетерная впадина

(fossa masseterica) овальная, умеренно глубокая, ее передний край заходит за уровень заднего края m1. Задний край венечного отростка (proc. coronoideus) субвертикальный. Основание углового отростка (proc. angularis) массивное. Сочленовный отросток (proc. articularis) расположен чуть ниже уровня альвеолярного края нижней челюсти. Край области крепления медиальной порции височной мышцы (musculus temporalis pars medialis) на поверхности венечного отростка хорошо выражен в рельефе кости. Его передняя часть находится вентральнее заднего края m2, а вентральная часть располагается на уровне середины сочленовного отростка. Рельефность и низкое положение края области крепления на челюсти указывают на специализированное мощное развитие височной мышцы.

От р2 сохранилась только задняя часть альвеолы, поэтому неясно, был ли он однокорневым или двухкорневым. Судя по альвеолам, р3 – двухкорневой, крупнее р2, но меньше, чем р4. Задняя альвеола р3 немного больше передней.

Последний премоляр р4 – довольно крупный, массивный зуб. Коронка слегка асимметричная, слабо расширяется в задней части. Главный бугорок конический, с развитым дистальным гребнем. Выраженный передний цингулид отсутствует, задний цингулид без бугорков. Задний конец коронки р4 слегка перекрывает буккально пара-

**Таблица 1.** Размеры (в мм) нижнечелюстной кости *Mustela strandi* Kormos, 1934 из плейстоцена Европы (*n* – число экземпляров)

Промеры	пещера Таврида, Крым, Россия (экз. ИЭРЖ, № 727/2263)	Кози Гжбет*, Польша			Брассо, Венгрия
		пределы	среднее	<i>n</i>	
Длина основания венечного отростка	9.03	–	–	–	–
Высота за р4	5.56	–	–	–	–
Высота за m1	6.51	5.5–6.3	5.7	3	–
Толщина под р4	3.0	–	–	–	–
Толщина под m1	2.96	2.8–3.4	3.0	3	–
Длина р3–m2	14.47	–	–	–	–
Длина р4–m1	10.27	–	–	–	–
Длина р4–m2	11.36	–	–	–	–
Длина m1–m2	7.98	–	–	–	–
Длина р4	3.62	3.3–3.7	3.5	4	3.4
Ширина р4	1.97	1.4–1.9	1.6	5	1.8
Длина m1	6.8	6.2–6.7	6.5	4	6.65
Длина тригониды m1	5.18	–	–	–	–
Ширина тригониды m1	2.48	2.2–2.7	2.4	4	2.35
Ширина талонида m1	2.07	1.5–1.8	1.7	4	1.6
Длина m2	1.55	1.6–2.0	1.8	4	1.5
Ширина m2	1.45	1.5–1.9	1.7	4	1.4

\*Размеры по [5, 6].

конид m1. Вершина главного бугорка р4 выше параконида и протокониды m1 (рис. 1а). Поверхность эмали р4 и m1 гладкая, без выраженной струйчатости.

Коронка хищнического зуба m1 крупная, продольно вытянутая, без выступов в середине и сужения в области передней части талонида. Лингвальный цингулид почти полный, прерывается только на небольшом участке в средней части, буккальный цингулид не развит. Параконид m1 ниже протокониды (рис. 1а), хищническая вырезка глубокая и широкая, метаконидный гребень отсутствует. Талонид режущего типа – без талонидного бассейна. Талонид удлинённый, почти равен по длине паракониду. Гипоконид увеличен, имеет вид режущего гребня и расположен на продольной оси зуба. Задний цингулидный бугорок на талониде отсутствует. Дополнительный корень между передним и задними корнями не развит.

Последний моляр m2 редуцированный, но довольно крупный, смещен лингвально продольной оси m1 (рис. 1б). Окклюзиальная поверхность m2 расположена выше уровня талонида m1 (рис. 1в). Коронка m2 имеет форму слабо удлинённого овала. На уплощенной окклюзиальной поверхности имеется невысокий узкий гребень, вытянутый продольно.

Размеры нижнечелюстной кости и зубов экз. ИЭРЖ, № 727/2263 приведены в табл. 1.

По длине и ширине хищнический зуб m1 экз. ИЭРЖ, № 727/2263 близок к таковым *M. strandi* из среднеплейстоценового местонахождения Брассо в Венгрии и раннеплейстоценового (конец раннего плейстоцена) местонахождения Кози Гжбет в Польше (рис. 2). Следует отметить, что экз. ИЭРЖ, № 727/2263 по размерам (высота тела нижней челюсти за m1, длина и ширина р4, длина m1, ширина талонида m1) превосходит образцы из местонахождений Кози Гжбет и Брассо (табл. 1). На графике (рис. 2) видно, что *M. palerminea* имеет существенно меньшие размеры m1, тогда как *M. cf. sibirica* из Китая, *M. putorius stromeri* и *M. cf. eversmannii* из Европы по размерам m1 крупнее, чем *M. strandi*.

От современных среднеразмерных представителей рода *Mustela*, населяющих Северную Евразию (*M. erminea* и *M. altaica*), и от ископаемой *M. palerminea* экз. ИЭРЖ, № 727/2263 отличается более крупными размерами. Также описываемый экземпляр от упомянутых видов отличаются следующие морфологические признаки: (1) рельефный край области прикрепления височной мышцы спереди не заходит за задний край m2 и вентрально достигает уровня сочленовного отростка;

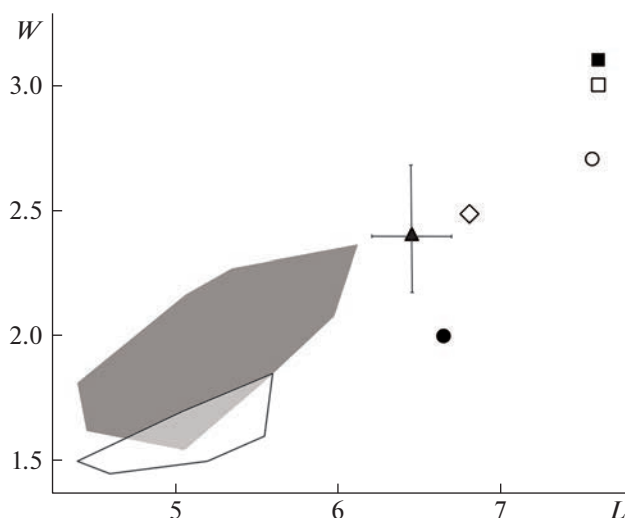


Рис. 2. Размеры m1 представителей *Mustela* из плейстоцена Евразии. Обозначения: L – длина m1, W – наибольшая ширина m1; черный квадрат – *M. putorius stromeri* Kormos, 1934 [5], белый квадрат – *M. cf. eversmanii* (Lesson, 1827) [7], белый круг – *M. cf. sibirica* Pallas, 1773 [9]; *M. strandi* Kormos, 1934: черный треугольник (с пределами изменчивости) [6], черный круг [5], белый ромб – экз. ИЭРЖ, № 727/2263; *M. palerminea* (Petenyi, 1864): серая область [13], белая область [5].

(2) сочленовный отросток расположен ниже уровня альвеолярного края нижней челюсти; (3) массетерная впадина протягивается вперед за уровень заднего края m1; (4) р4 крупный, массивный; (5) передний цингулид на р4 почти полностью отсутствует; (6) главный бугорок р4 имеет развитый дистальный гребень; (7) вершина главного бугорка р4 выше вершин параконида и протоконида m1; (8) эмаль р4 и m1 без струйчатости; (9) m2 смещен лингвально относительно оси m1 (в окклюзиальной проекции); (10) m2 довольно крупный относительно размеров m1. Указанные номера признаков (с дополнениями) ниже использованы для сравнения с другими видами.

От *M. sibirica* экз. ИЭРЖ, № 727/2263 отличается признаками 1, 2 и 8, а также (11) отсутствием лингвального бассейна на талониде m1, (12) отсутствием дополнительного корня в средней части m1, (13) отсутствием расширения (вздутия) m1 в средней части коронки с лингвальной стороны.

От *M. putorius* и *M. eversmanii* отличается признаками 1, 2, 6, 8, 12, а также (14) почти полным лингвальным цингулидом, прерывающимся в средней части m1, (15) отсутствием гипоконулида на m1, (16) лингвальным смещением m2 относительно m1.

От *M. lutreola* отличается признаками 1, 2, 8, 11, 13, 14, а также (17) талонидом m1 режущего типа, сформированным из гипоконида.

От *Neogale vison* отличается признаками 8, 13, 14, 16, 17, а также (18) отсутствием бугорков на заднем цингулиде р4 и (19) отсутствием буккального цингулида на m1.

Таким образом, отмеченные на экз. ИЭРЖ, № 727/2263 признаки 1 и 2 (рельеф и положение края области крепления медиальной порции височной мышцы и расположение сочленовного отростка) не встречаются у других видов рода *Mustela*. Т. Кормош [5] ранее указывал на захождение рельефного края области крепления височной мышцы за уровень заднего края m2 как видоспецифичный признак *M. strandi*.

Т. Вишневецкая [6] сближала *M. strandi* с современным колонком *M. sibirica*. Мы тоже отмечаем, что эти виды разделены наименьшим числом признаков по сравнению с другими современными представителями рода *Mustela*.

Морфологические признаки нижнечелюстной кости и зубов экз. ИЭРЖ, № 727/2263 сходны с описанными ранее для *M. strandi* [5, 6, 13, 15]. Размерные характеристики экз. ИЭРЖ, № 727/2263 сближают его с находками из Брассо и Кози Гжбет. Однако при этом форма из пещеры Таврида выделяется особо крупными размерами нижней челюсти, р4 и m1 при наличии сравнительно небольшого m2. Можно предположить, что в первой половине плейстоцена у *M. strandi* стала проявляться тенденция к уменьшению размеров; это позволяет объяснить относительно мелкие размеры более поздних представителей вида в Европе.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Г.В. Самохину и Б.А. Вахрушеву (Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского) за помощь в организации и проведении экспедиционных работ. Авторы выражают благодарность М. Гаспарику (Венгерский музей естественной истории) за помощь в получении публикаций и признательны Л. Макади (Геологический музей Будапешта) за предоставленную возможность работы с коллекцией из местонахождения Брассо.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00214 (“Наземные позвоночные Крыма в раннем плейстоцене”), <https://rscf.ru/project/22-14-00214/>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stach J. On some Mustelinae from the Pliocene bone breccias of Weže // Acta Palaeontologica Polonica. 1959. V. 4. No 2. P. 101–118.
2. Morlo M., Kundrát M. The first carnivoran fauna from the Ruscinium (Early Pliocene, MN 15) of Germany // Paläontologische Zeitschrift. 2001. V. 75. P. 163–187.



3. *Sato J.J., Wolsan M., Prevosti F.J. et al.* Evolutionary and biogeographic history of weasel-like carnivorans (Musteloidea) // *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 2012. V. 63. № 3. P. 745–757.
4. *Wilson D.E., Reeder D.M.*, eds. *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.
5. *Kormos T.* Neue und wenig bekannte Musteliden aus dem ungarischen Oberpliozän // *Folia Zoologica et Hydrobiologica*. 1934. V. 5. P. 129–158.
6. *Wiszniewska T.* Middle Pleistocene Carnivora (Mammalia) from Kozi Grzbiet in the Swietokrzyskie Mts, Poland // *Acta Zoologica Cracoviensia*. 1989. V. 32. № 14. P. 589–630.
7. *Thenius E.* Die Carnivoren-Reste aus dem Altpleistozän von Voigtstedt bei Sangerhausen in Thüringen // *Paläontologische Abhandlungen*. Abt. A. 1965. V. 2. № 2–3. P. 537–564.
8. *Thabard C., Fourvel J.-B.* Les restes de *Mustela nivalis* Linnaeus, 1766 (Carnivora, Mustelidae) du gisement Pléistocène inférieur de Montoussé 5 (Hautes-Pyrénées, France) // *Comptes Rendus Palevol*. 2022. Art. 21 (28). P. 595–618.
9. *Pei W.* On the Carnivora from Locality 1 of Choukutien // *Palaeontologia Sinica*. Ser. C. 1934. V. 8. P. 1–217.
10. *Мотузко А.Н.* Фауна млекопитающих верхнего плиоцена, нижнего и начала среднего плейстоцена внеледниковой области Западной Сибири и ее палеогеографическое значение // Автореферат на соиск. уч. степени канд. географ. наук. Москва: МГУ, 1971. С. 1–16.
11. *Rabeder G.* Die Carnivoren (Mammalia) aus dem Altpleistozän von Deutsch-Altenburg 2. Mit Beiträgen zur Systematik einiger Musteliden und Caniden // *Beiträge zur Paläontologie von Österreich*. 1976. V. 1. P. 5–119.
12. *Palombo M.R., Sardella R., Novelli M.* Carnivora dispersal in Western Mediterranean during the last 2.6 Ma // *Quaternary International*. 2008. V. 179. № 1. P. 176–189.
13. *Marciszak A., Ambros D., Hilpert B.* Mustelids from Sackdilling Cave (Bavaria, Germany) and their biostratigraphic significance // *Geobios*. 2021. V. 68. P. 83–107.
14. *Гимранов Д.О., Цзянцзуо Ц., Лавров А.В., Лопатин А.В.* *Mustela palerminea* (Mustelidae, Carnivora) из раннего плейстоцена Крыма // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 511. С. 375–380.
15. *Éhik J.* Die präglaciale Fauna von Brasso (Vorläufiger Bericht) // *Földtany Közöny*. 1913. V. 43. P. 23–26.
16. *Marciszak A., Matyaszyk L.* Południowa Cave – first mid-Middle Pleistocene site from Sudety Mts (Silesia, SW Poland) and their biostratigraphic significance // *Proceedings of INQUA SEQS 2021 Conference*. Wrocław, Poland: University of Wrocław and Polish Geological Society, 2021. P. 64.
17. *Лопатин А.В., Вислобокова И.А., Лавров А.В. и др.* Пещера Таврида – новое местонахождение раннеплейстоценовых позвоночных в Крыму // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. № 3. С. 381–385.
18. *R Core Team.* R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, 2020. <https://www.R-project.org>.
19. *Wickham H.* ggplot2: elegant graphics for data analysis. New York: Springer-Verlag, 2016.

## **MUSTELA STRANDI (MUSTELIDAE, CARNIVORA) FROM THE EARLY PLEISTOCENE OF CRIMEA**

**D. O. Gimranov<sup>a, #</sup>, Q. Jiangzuo<sup>b, c</sup>, A. V. Lavrov<sup>d</sup>, and Academician of the RAS A. V. Lopatin<sup>d</sup>**

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

<sup>b</sup>*Key Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing, China*

<sup>c</sup>*Key Laboratory of Vertebrate Evolution and Human Origins of Chinese Academy of Sciences, Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China*

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

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

The dentary of *Mustela strandi* Kormos, 1934 is described from the Lower Pleistocene deposits (Late Villafranchian, 1.8–1.5 Ma) of the Taurida cave in Crimea. It is the first finding of *M. strandi* in Russia. This extinct mustelid species is rarely found in the Lower and Middle Pleistocene of Central Europe.

*Keywords:* *Mustela strandi*, mandible, Late Villafranchian, Taurida cave, Crimea

УДК 569.742.2

## СРЕДНЕГОЛОЦЕНОВЫЙ БУРЫЙ МЕДВЕДЬ (*URSUS ARCTOS*) С ОСТРОВА БОЛЬШОЙ ЛЯХОВСКИЙ (НОВОСИБИРСКИЕ ОСТРОВА)

© 2023 г. М. Ю. Чепрасов<sup>1,\*</sup>, Г. Г. Боескоров<sup>1,2</sup>, Г. П. Новгородов<sup>1</sup>, А. Н. Тихонов<sup>1,3</sup>,  
Л. В. Григорьева<sup>1</sup>, Е. С. Булыгина<sup>4</sup>, Н. В. Слободова<sup>4,5</sup>, Ф. С. Шарко<sup>4,6</sup>,  
А. В. Протопопов<sup>7</sup>, А. В. Недолужко<sup>8</sup>

Представлено академиком РАН О.Н. Пугачевым

Поступило 10.07.2023 г.

После доработки 26.07.2023 г.

Принято к публикации 28.07.2023 г.

Приводится морфологическое описание уникальной находки субфоссильного бурого медведя (*Ursus arctos* L., 1758) – его замороженной мумии, найденной впервые в истории. Находка представляет из себя хорошо сохранившуюся тушу зверя возрастом около 3.5 тысяч лет. Обсуждаются результаты исследования медведя методами компьютерной томографии и анализа ДНК.

**Ключевые слова:** бурый медведь, *Ursus arctos*, голоцен, Якутия, о. Большой Ляховский, полная туша, мягкие ткани, ДНК

**DOI:** 10.31857/S2686738923600498, **EDN:** XQKHRW

Плейстоценовые остатки *U. arctos*, представленные костями скелета, достаточно редки и встречаются на территории Якутии с начала среднего неоплейстоцена [1, 2].

Первая находка замороженной мумии древнего бурого медведя была обнаружена в августе 2020 г. на

острове Большой Ляховский (Новосибирский архипелаг) в 8 км северней устья р. Большой Этерикан, от которой медведь получил название “Этериканский”.

Вытаивающую из мерзлоты тушу медведя обнаружили оленеводы общины “Муостаах” на склоне обрыва моря Лаптевых. В марте 2021 г. туша медведя была привезена в г. Якутск в Музей мамонта, где хранится в морозильной камере при  $t = -20^{\circ}\text{C}$  под инвентарным номером ММ-F54.

Ветеринарные исследования не выявили возбудителей сибирской язвы, трихинеллеза и других особо опасных заболеваний.

Радиоуглеродное датирование, проведенное по лучевой кости правой конечности в Carbon Analysis Lab Co., Ltd. (Южная Корея), показало, что возраст находки относится к среднему голоцену ( $3460 \pm 40$  л.н. (OTg220171), не калиброванная дата) [3].

Компьютерная томография ископаемого *U. arctos* была проведена 20.04.2022 г. в диагностическом центре “RadX-Med” (г. Якутск) с помощью томографа “Toshiba Aquilion 16”. Измерения черепа и нижней челюсти выполнены по методике Г.А.Новикова [4] с помощью программного обеспечения “Vidar Dicom Viewerс 3.0”.

Туша хорошо сохранилась (рис. 1) и незначительно мумифицирована. Спина деформирована (уплощена), по-видимому, из-за травмы, приведшей к гибели особи (см. ниже), а также вследствие длительной транспортировки мумии с ост-

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова”, Якутск, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт геологии алмаза и благородных металлов Сибирского отделения Российской академии наук”, Якутск, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Зоологический институт Российской академии наук”, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>5</sup>Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

<sup>6</sup>Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук”, Москва, Россия

<sup>7</sup>Академия наук Республики Саха, Якутск, Россия

<sup>8</sup>Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования “Европейский университет в Санкт-Петербурге”, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: nohsho@mail.ru



**Рис. 1.** Замороженная туша Этериканского медведя. Вверху — вид сбоку, в середине — вид сверху, внизу — вид снизу.

рова Б. Ляховский при положительных температурах воздуха.

Особенности телосложения и пропорции тела характерны для бурого медведя: голова большая и тяжелая с широким и относительно высоким лбом, умеренно вытянутая; конец носа крупный, черного цвета; губы большие, способные к вытягиванию. Холка высокая, передние конечности относительно длинные, мощные. Задняя часть тела (круп и бедра) массивнее передней. Подошвы кистей и стоп лишены волос (рис. 1, 2). По наружным половым органам определено, что медведь был самкой.

Шерсть имеет желтовато-светлокоричневый цвет (верх головы, плечи), бурый, темно-бурый и почти черный цвет (шея, бедра, пах). На большей части спины она выпала. На спине и плечах сохранились участки двуцветных волос: нижняя их часть светло-коричневая, верхняя — бурая. Нижние части лап темнее спины, покрыты короткими темно-бурыми, почти черными волосами. Длина волос: 8–8.2 см (брюхо), 10–12 см (шея), 10–11 см (плечи, бедра), 11–13.5 см (пах), 11–11.5 см (бока).

Мех плотный с длинными остевыми волосами до 12–15 см и с густым подшерстком характерен для бурого медведя в осенне-зимний период [1, 5].

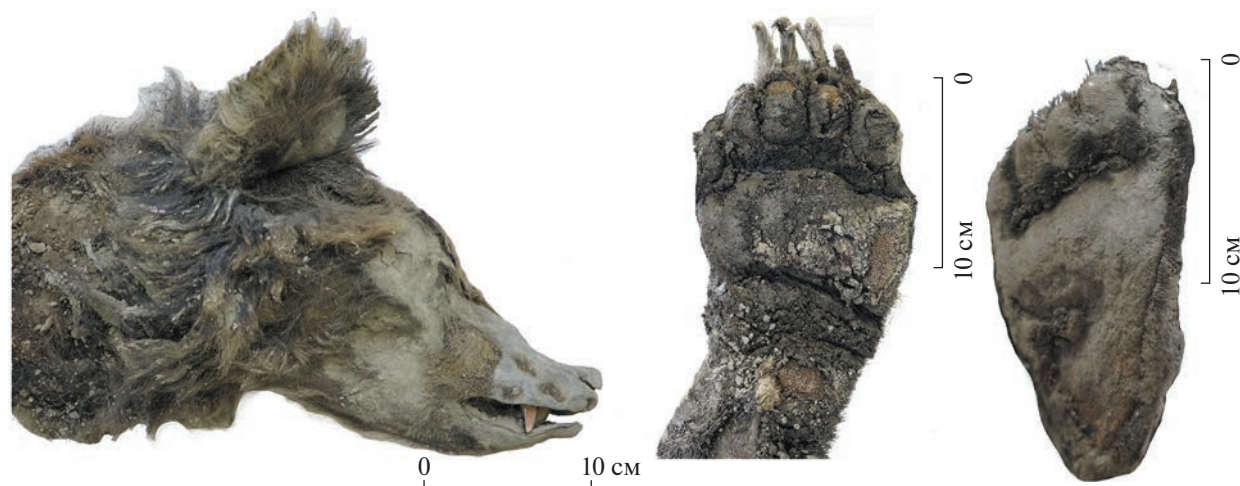


Рис. 2. Части тела Этериканского медведя. Слева – голова, вид сбоку. В середине и справа – подошвы передней и задней лап.

Высокая упитанность медведя и большое количество абдоминального жира (толщиной до 4–5 см), указывают на то, что он был готов залечь в спячку или только что пробудился [6].

По совокупности признаков (степень зарастания венечного и носового швов [7, 8], степень стертости зубов [8], ширина пальмарной мозоли (табл. 1)) можно констатировать, что Этериканская медведица была половозрелой особью возрастом около 5 лет.

По ряду промеров тела медведь с Б. Ляховского острова превышает параметры самок современного бурого медведя из Верхоянья и соответствует таковым более крупной формы медведя из

центральной Якутии (табл. 1). Самки *U. arctos* из Северо-Востока Азии (Чукотка, бассейн р. Омолон, северное Приохотье) [6] более крупные, чем медведи из Якутии (табл. 1).

По большинству промеров черепа исследуемый *U. arctos* соответствует средним размерам черепов самок современного вида с территории Якутии, измеренных нами, и по ряду промеров несколько превосходят черепа медведиц из Верхоянья и южной Якутии [1] (табл. 2). Бурый медведь из Северо-Востока Азии в среднем крупнее современных и субфоссильного медведя из Якутии (табл. 2).

Таблица 1. Размеры (в см) и масса тела (в кг) взрослых самок бурых медведей из Восточной России

Размеры и масса	Современные							Субфоссильный
	Якутия, Верхоянье [9], <i>n</i> = 3		Центральная Якутия, <i>n</i> = 4*		Северо-Восток Азии **			Якутия, о. Б. Ляховский
	Limit (пределы вариаций)	М (средняя)	Limit	М ± m***	Limit	М ± m	<i>n</i>	
Высота в холке	73–84	77	73–88	80.5 ± 3.23	82–111	96.2 ± 2.51	11	75
Длина тела	135–145	140	160–172	160 ± 2.55	160–197	172.4 ± 3.96	11	155–160
Обхват груди за лопатками	63–71	68	89–110	98.8 ± 4.4	65–144	113.0 ± 9.08	7	114
Длина уха	13–13	13	9–11	9.8 ± 0.75	10–14	11.8 ± 0.40	10	10.5
Ширина передней мозоли	11–11.5	11.2	12–13	12.4 ± 0.24	11.5–15.5	13.9 ± 0.36	11	11.8
Длина ступни	22–23	22	–	–	–	–	–	22.4
Масса тела	56–75	65	–	–	105–170	134.9 ± 8.33	8	77.6

\*неопубл. данные Боевского Г.Г.; \*\*вычисления Боевского Г.Г. по: [6]; \*\*\**m* – ошибка средней.

Таблица 2. Размеры черепа (мм) взрослых самок бурых медведей из Восточной России

Промеры	Современные							Субфос- сильный
	Якутия					Северо-Восток Азии		Якутия
	[9]; n = 5		наши данные			[6]; n = 7		о. Б.
	Limit	M±m	Limit	M±m	n	Limit	M±m	Ляховский
Кондилобазальная длина	256–278	268.0 ± 3.69	263–302	286.0 ± 4.42	7	271.5–332	307.7 ± 8.7	294.9
Общая длина	272–296	285.0 ± 1.48	274–311	298.3 ± 3.79	9	–	–	297.4
Длина твердого неба	139–149	145.0 ± 1.94	142–154.6	151.5 ± 2.0	6	142–176.1	160.4 ± 4.5	147.8
Переднезадний диаметр клыка у основания	–	–	15.6–19	17.0 ± 0.38	9	–	–	17.3
Длина верхнего ряда щечных зубов P4 – M2	66–68	67.3 ± 0.16	62–79	70.06 ± 1.57	9	–	–	69.4
Скуловая ширина	167–183	176.0 ± 2.86	168–198	177.0 ± 4.19	7	117.3–220.0	190.0 ± 14.2	182
Высота затылка	72–87	82.6 ± 1.89	72.5–83	79.74 ± 4.62	5	–	–	78.4
Ширина в надглаз- ничных отростках	92–94	93.8 ± 0.37	89.4–106	96.3 ± 2.57	7	–	–	100.6

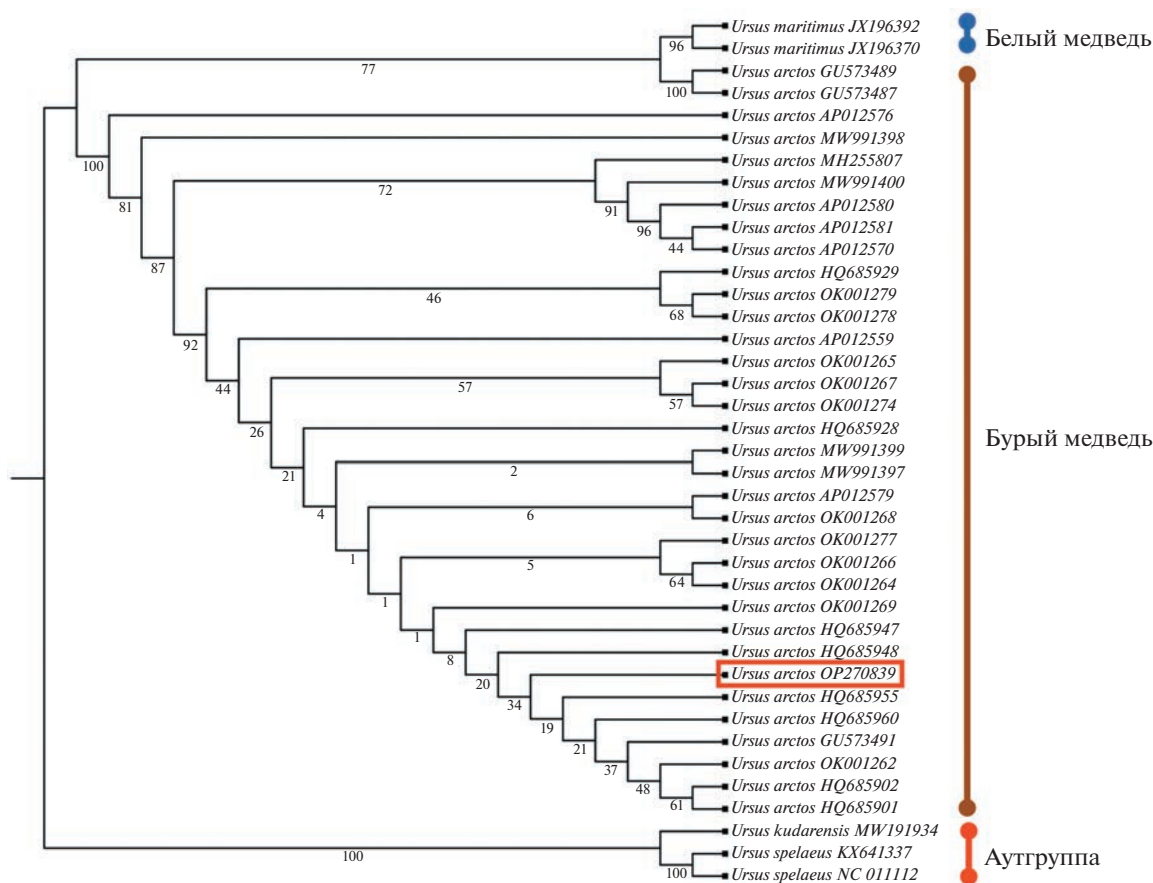
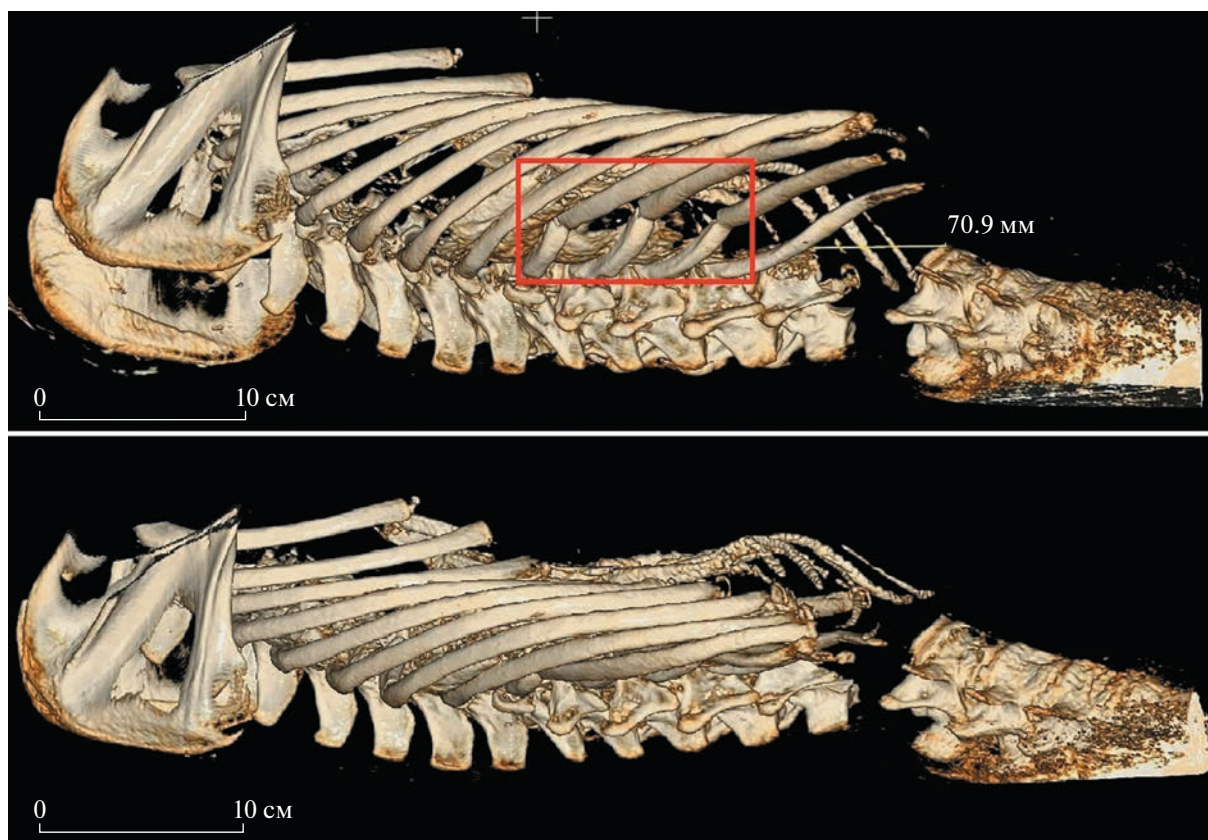


Рис. 3. Реконструкция филогенетического дерева видов рода *Ursus* построенная на основании последовательностей гена цитохрома б (*CYTB*) и контрольной области митохондриальной ДНК (D-петля) методом максимального правдоподобия (ML). Бутстреп значения указаны под ветвями филогенетического дерева. Номера NCBI представителей рода *Ursus* указаны на окончаниях ветвей дерева. Образец Этериканского медведя отмечен красным прямоугольником. В качестве аутгруппы выбраны образцы пещерного медведя (*U. spelaeus*) и кударского пещерного медведя (*U. kudarensis*).



**Рис. 4.** Механические повреждения костей скелета Этериканского медведя. На верхнем рисунке (латерально-дорсальный вид) красным квадратом отмечены места переломов ребер. На нижнем рисунке (латеральный вид) показана сдавленная грудная клетка.

Некрупные размеры Этериканского медведя, схожие с таковыми современного *U. arctos* Якутии, могут свидетельствовать о том, что своеобразная экоморфа якутского медведя, обитающая в суровых условиях со скудным низкокалорийным рационом, сформировалась к середине голоцена.

Молекулярно-генетическое исследование мягких тканей Этериканского медведя проводили в НИЦ “Курчатовский институт” с соблюдением всех необходимых для подобных экспериментов условий. Из мышечной ткани была выделена ДНК и приготовлены ДНК-библиотеки, как было описано ранее [10]. ДНК-библиотеки были секвенированы на приборе Illumina NovaSeq6000. Полученные данные секвенирования прошли стандартные процедуры очистки, используя программный конвейер PALEOMIX 1.2.14 [11]. Последовательность митогенома была получена с применением программного обеспечения SPAdes v3.15.3 [12]. Для видовой идентификации были отобраны последовательности гена цитохрома б (*CYTB*) и контрольной области митохондриальной ДНК (D-петля). Филогенетическая реконструкция с использованием RaXML

v8.2.12. [13], показала, что Этериканский бурый медведь (OP270839) группируется вместе с современными бурыми медведями (рис. 3).

Причиной гибели медведя стало механическое повреждение позвоночного столба, а также закрытая торакальная травма. В результате повреждения позвоночника произошло его отделение на уровне первого и второго поясничных позвонков (травматическая ампутация), что, по-видимому, привело к разрыву спинного мозга и параличу нижнего отдела тела. Закрытая травма грудной клетки сопровождалась компрессионной механической асфиксией (сдавливание груди и живота твердым предметом) с ее смещением вправо и переломом 10-го-12-го ребер (рис. 4). По-видимому, медведь был придавлен свисавшей глыбой монолитной многолетней мерзлоты.

Место обнаружения мумии медведя расположено в 250–300 км от современной северной границы распространения *U. arctos*, которая в Якутии ограничивается лесотундрой, в зону тундры он заходит очень редко и только в летнее время [9].

Пока неясна причина обнаружения бурого медведя на острове Б. Ляховский: был ли это необычно дальний заход от основного места обита-

ния, каким образом он попал на остров – вплавать через пролив Дм. Лаптева или по льду в весеннее время? Мог ли этот медведь найти в голоцене приемлемые условия для обитания на острове? Эти вопросы нам предстоит выяснить в процессе дальнейшего изучения Этериканского медведя.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования М.Ю. Чепрасова, Г.П. Новгородова выполнены в рамках Государственного задания СВФУ им. М.К. Аммосова FSRG-2023-0027. Исследования Г.Г. Боескорова выполнены в рамках Государственного задания ИГАБМ СО РАН. Исследования Ф.С. Шарко выполнены при поддержке НИЦ Курчатовский институт (Приказ № 90 от 20.01.2023 г.) и в рамках Государственного задания ФИЦ “Биотехнологии” РАН.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 22-2400282).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боескоров Г.Г., Барышников Г.Ф. Позднечетвертичные хищные млекопитающие Якутии. СПб.: Наука, 2013. 199 с.
2. Boeskorov G.G., Baryshnikov G.F., Tikhonov A.N. et al. New Data on Large Brown Bear (*Ursus arctos* L., 1758, Ursidae, Carnivora, Mammalia) from the Pleistocene in Yakutia. // Dokl. Earth Sc. 486, 617–622 (2019).
3. Boulygina E., Sharko F., Cheprasov M. et al. Ancient DNA Reveals Maternal Philopatry of the Northeast Eurasian Brown Bear (*Ursus arctos*) Population during the Holocene. // Genes. 2022; 13(11):1961.
4. Новиков Г.А. Хищные млекопитающие фауны СССР. М.; Л.: АН СССР, 1956. 294 с.
5. Гентнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон П.Б. и др. Морские коровы и хищные. Т. 2. Млекопитающие Советского Союза. М.: Высш. школа, 1967. 1004 с.
6. Чернявский Ф.Б., Кречмар М.А. Бурый медведь (*Ursus arctos* L.) на Северо-Востоке Сибири. Магадан: ИБПС СВНЦ ДВО РАН, 2001. 93 с.
7. Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: Тов. научн. изд. КМК, 2007. 283 с.
8. Гуськов В.Ю. Методика определения возраста бурого медведя (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) по черепу // Успехи наук о жизни, 2014. № 9. С. 100–106.
9. Тавровский В.А., Егоров О.В., Кривошеев В.Г. и др. Млекопитающие Якутии. М.: Наука, 1971. 659 с.
10. Boulygina E., Tsygankova S., Sharko F., et al. // Journal of Archaeological Science: Reports. 2020. V. 31. P. 102357.
11. Schubert M., Ermini L., Der Sarkissian C. et al. // Nature Protocols. 2014. V. 9. P. 1056–1082.
12. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. // Journal of Computational Biology. 2012. V. 19. P. 455–477.
13. Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. // Systematic Biology. 2008. V. 57. P. 758–771.

## MIDDLE HOLOCENE BROWN BEAR (*URSUS ARCTOS*) FROM BOLSHOY LYAKHOVSKY ISLAND (NEW SIBERIAN ISLANDS)

M. Yu. Cheprasov<sup>a, #</sup>, G. G. Boeskorov<sup>a, b</sup>, G. P. Novgorodov<sup>a</sup>, A. N. Tikhonov<sup>a, c</sup>, L. V. Grigorieva<sup>a</sup>,  
E. S. Boulygina<sup>d</sup>, N. V. Slobodova<sup>d, e</sup>, F. S. Sharko<sup>d, f</sup>, A. V. Protopopov<sup>g</sup>, and A. V. Nedoluzhko<sup>h</sup>

<sup>a</sup>Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “M. K. Ammosov North-Eastern Federal University”, Yakutsk, Russian Federation

<sup>b</sup>Diamond and Precious Metal Geology Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Yakutsk, Russian Federation

<sup>c</sup>Zoological Institute Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup>National Research Centre Kurchatov Institute, Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup>HSE University, Moscow, Russian Federation

<sup>f</sup>Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>g</sup>Academy of Sciences of Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russian Federation

<sup>h</sup>European University at Saint Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS O.N. Pugachev

Here, we present a detailed description of a unique find – a subfossilized brown bear (*Ursus arctos* L., 1758) that has been preserved in permafrost. The well-preserved carcass is dated to approximately 3.5 kilo years old (Ky). The results of classical morphological, computed tomography, and ancient DNA analyses of this Holocene brown bear mummy are discussed in this study.

**Keywords:** brown bear, *Ursus arctos*, Holocene, Yakutia, Bolshoy Lyakhovsky Island, complete carcass, soft tissues, DNA

УДК 599.742.2: [591.471+591.13]: [550.424:546.027](470.5)

## СОДЕРЖАНИЕ ИЗОТОПОВ $^{13}\text{C}$ И $^{15}\text{N}$ В КОЛЛАГЕНЕ КОСТЕЙ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ, ВОЗРАСТНЫХ И ПОЛОВЫХ ГРУПП УРАЛЬСКОГО ПЕЩЕРНОГО МЕДВЕДЯ (MAMMALIA, CARNIVORA, URSIDAE, *URSUS (SPELAEARCTOS) KANIVETZ VERESTCHAGIN, 1973*)

© 2023 г. П. А. Косинцев<sup>1,\*</sup>, К. Ю. Коновалова<sup>1</sup>, Г. В. Симонова<sup>2</sup>

Представлено академиком РАН В.Н. Большаковым

Поступило 08.08.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принято к публикации 02.09.2023 г.

Проведен анализ данных о содержании изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  в коллагене костей уральского пещерного медведя (*Ursus (S.) kanivetz Verestchagin, 1973*) с Северного и Среднего Урала. Кости датируются первой половиной МИС 3. Изучены кости новорожденных особей, особей в возрасте 1 год, самцов и самок в возрасте 2, 3, 4 лет и старше 4 лет. Различия значений  $\delta^{13}\text{C}$  между возрастными, половыми и географическими выборками не достоверны. С возрастом значимо уменьшается величина  $\delta^{15}\text{N}$ , что связано с переходом от молочного питания к самостоятельному питанию. В составе диеты взрослых медведей Среднего Урала была выше доля мясной пищи, чем в составе диеты взрослых медведей Северного Урала. Заметные различия изотопных подписей между самцами и самками разного возраста отсутствуют. Большие пещерные медведи Урала и Европы имели сходный тип диеты.

**Ключевые слова:** *Ursus kanivetz*, уральский пещерный медведь, поздний плейстоцен, Урал, стабильные изотопы,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , коллаген

DOI: 10.31857/S2686738923600565, EDN: HRRPRQ

Анализ содержания изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  в тканях живых организмов широко используется для реконструкции среды обитания и экологии видов в прошлом и настоящем. Он позволяет оценить положение вида в трофической цепи и охарактеризовать особенности его питания. Особенно большое значение изучение изотопов имеет для вымерших видов. Один из самых больших массивов данных по изотопному составу углерода и азота в коллагене костей получен для больших пещерных медведей (*Ursus (Spelaearctos) spelaeus s.l.*) Западной и Центральной Европы [1–7]. Данные о содержании изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  в коллагене костей больших пещерных медведей Восточной Европы и Урала крайне малочисленны [8].

Анализ морфологических данных и ядерной ДНК показал, что в Восточной Европе и на Урале в позднем плейстоцене обитал один вид большого пещерного медведя – уральский пещерный

медведь (*Ursus (S.) kanivetz Verestchagin, 1973*) [9, 10]. В Центральной Европе обитало три вида – *U. (S.) spelaeus* Rosenmuller 1794, *U. (S.) eremus* Rabeder, Hofreiter, Nagel et Withalm, 2004 и *U. (S.) kanivetz* Verestchagin, 1973; в Западной Европе обитало два вида больших пещерных медведей – *Ursus (S.) spelaeus* Rosenmuller 1794 и *U. (S.) eremus* Rabeder, Hofreiter, Nagel et Withalm, 2004 [10, 11].

Изучено содержание изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  в коллагене костей уральского пещерного медведя из пещеры Тайн на Среднем Урале [8] и пещеры Медвежья на Северном Урале. Выборка из пещеры Тайн дополнена новыми образцами. Пещера Медвежья (62°05' с. ш., 58°05' в. д.) имеет карстовое происхождение, горизонтальный тип строения, длину 480 м и высоту над уровнем моря 280 м [12]. Это северо-восточный край ареала (*Ursus (S.) spelaeus s.l.*) [9]. В отложениях пещеры найдено более 3000 костей большого пещерного медведя, среди которых есть остатки всех возрастных групп от новорожденных до старых особей. Это типичное “кладбище” пещерных медведей, где животные погибли во время зимней спячки. По костям пещерного медведя получены радиоуглеродные (AMS) даты: >48600 BP, no.? [13]; 42000 ± 450 BP, OxA-19608; 45150 ± 600 BP,

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

<sup>2</sup>Институт мониторинга климатических и экологических систем Сибирского отделения Российской академии наук, Томск, Россия

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



**Таблица 1.** Значения  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) и стандартное отклонение (sd) в коллагене костей уральского пещерного медведя (*U. (S.) kanivetz*) Северного и Среднего Урала

Пол <sup>1</sup>	Возраст	n	$\delta^{13}\text{C}_{\text{min}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{cp}} \pm \text{sd}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{min}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{max}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{cp}} \pm \text{sd}$
Северный Урал								
♂	>4+	9	-23.6	-21.2	-22.3 ± 0.84	2.4	5.4	3.9 ± 1.04
♀		5	-23.4	-21.8	-22.6 ± 0.58	2.8	4.9	3.8 ± 0.93
♂	3+, 4+	4	-22.2	-21.7	-21.9 ± 0.21	3.9	5.8	4.8 ± 0.84
♀		3	-23.6	-21.7	-22.4 ± 1.01	3.4	4.2	3.9 ± 0.44
♂	2+	4	-23.1	-21.9	-22.5 ± 0.61	4.3	6.6	5.2 ± 0.98
♀		4	-22.1	-20.2	-21.0 ± 0.94	4.6	11.3	7.1 ± 3.08
?	1+	23	-22.9	-21.4	-22.4 ± 0.35	5.0	8.4	6.7 ± 0.86
?	0+	2	-23.9	-22.4	-23.2 ± 1.08	8.3	9.0	8.7 ± 0.52
Средний Урал								
♂	>4+	5	-22.1	-21.3	-21.7 ± 0.37	3.2	4.9	4.1 ± 0.68
♀		2	-22.2	-21.8	-22.0 ± 0.26	4.6	4.6	4.6
♂	3+, 4+	3	-22.5	-22.1	22.2 ± 0.23	3.2	4.0	3.7 ± 0.42
♀		4	-22.0	-21.4	-21.7 ± 0.28	3.0	4.6	4.0 ± 0.78
♂	2+	1			-22.8			7.2
♀		3	-22.1	-21.7	-21.8 ± 0.23	5.4	5.7	5.6 ± 0.15
?	1+	5	-22.8	-21.9	-22.5 ± 0.34	4.8	7.8	6.4 ± 1.11
?	0+	2	-24.2	-23.2	-23.7 ± 0.71	7.5	9.0	8.3 ± 1.06

<sup>1</sup> ♂ – самцы, ♀ – самки, ? – пол не определен.

Оха-19568 [10], что соответствует первой половине морской изотопной стадии 3 (MIS 3) позднего плейстоцена. Пещеры Тайн и Медвежья имеют один тафономический тип (“кладбище”), накопление костей происходило в один период – первая половина MIS 3 (57000–40000 лет назад).

Для анализа взяты 45 плечевых, 8 лучевых и 1 большая берцовая кости. Определение пола и возраста особей, которым принадлежали кости, проведено на основании анализа их размеров и состояния эпифизов (приросли – не приросли) [14–17]. Среди них есть кости самцов и самок в возрасте 2+, 3+ и 4+ лет (полузрелые, subadultus) и старше 4+ лет (>4+, взрослые, adultus) (табл. 1). Пол особей в возрасте 0+ и 1+ лет не определен. Каждая кость принадлежит отдельной особи. Особи в возрасте 0+ имеют только молочное питание, особи в возрасте 1+ имеют смешанный тип питания (молочное и самостоятельное), с возраста 2+ животные переходят на самостоятельное питание [18].

Определение изотопного состава углерода ( $\delta^{13}\text{C}$ ) и азота ( $\delta^{15}\text{N}$ ) в коллагене костей проведено методом изотопной масс-спектрометрии с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия), оснащенного элементным анализатором

Flash 2000 (приборы предоставлены центром коллективного пользования ТомЦКП СО РАН) по стандартной методике. В качестве международного стандарта углерода принят эталон VPDB. В качестве международного стандарта азота принят газообразный  $\text{N}_2$  атмосферного воздуха. Лабораторные рабочие газы сравнения  $\text{CO}_2$  и  $\text{N}_2$  калибровали по международному стандартному образцу МАГАТЭ – IAEA-600 Caffeine. Абсолютная погрешность измерений трех последовательных измерений анализируемых образцов для  $\delta^{13}\text{C}$  не превышала  $\pm 0.2\text{‰}$ , а для  $\delta^{15}\text{N}$  не превышала  $\pm 0.4\text{‰}$ .

Значения изотопного состава углерода и азота в коллагене костей уральского пещерного медведя представлены в табл. 1.

Средние значения  $\delta^{13}\text{C}$  в группах полузрелых и взрослых самцов и самок на Северном Урале различаются не более чем на  $0.5\text{‰}$ , а значения  $\delta^{15}\text{N}$  не более чем на  $0.9\text{‰}$  (табл. 1). На Среднем Урале эти различия составляют для  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  не более  $0.5\text{‰}$  (табл. 1). В целом значения  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  для групп полузрелых и взрослых особей близки.

Различия значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  в группах молодых особей – 2+, 1+ и 0+ лет значительно больше. Различия в величине  $\delta^{13}\text{C}$  между самцами и самками в группе 2+ года на Северном Урале состав-

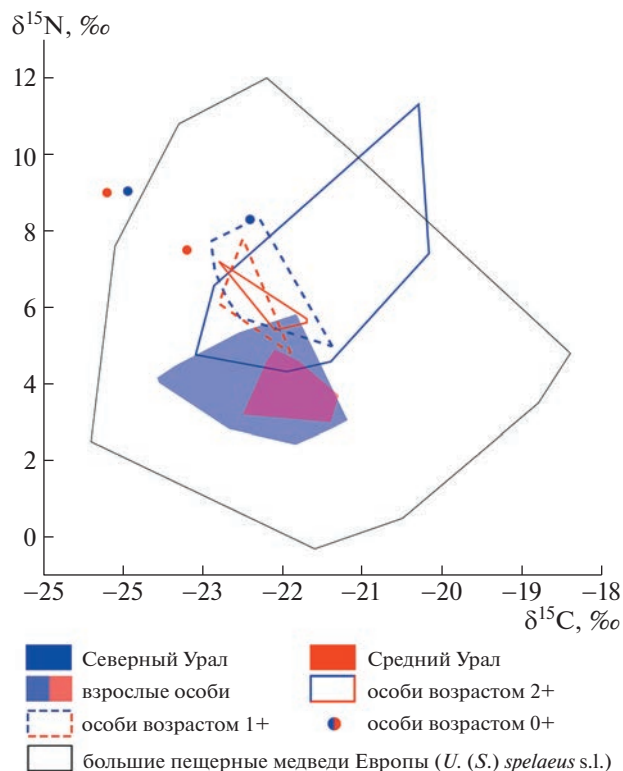
ляют 1.5‰, а на Среднем Урале – 1.0‰. Различия в величине  $\delta^{15}\text{N}$  составляют соответственно 1.9 и 1.6‰ (табл. 1). Различия в величине  $\delta^{13}\text{C}$  между группами 1+ и 0+ на Северном Урале составляют 0.8‰, на Среднем Урале – 1.2‰, а различия в величине  $\delta^{15}\text{N}$  соответственно 2.0 и 1.9‰ (табл. 1).

Распределение значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  возрастных групп 1+ с Северного и Среднего Урала практически совпадает и почти полностью лежит за пределами значений для взрослых особей (рис. 1). Распределение значений для возрастных групп 2+ Северного и Среднего Урала совпадает и частично перекрывается с распределением значений взрослых групп (рис. 1). Совпадают значения возрастных групп 2+ и со значениями для возрастных групп 1+. Значения для особей 0+ находятся за пределами значений для остальных возрастных групп (рис. 1).

Статистическая оценка различий между выборками (при  $n > 4$ ) проведена по непараметрическому тесту Манна–Уитни. Значения  $\delta^{13}\text{C}$  между всеми выборками статистически значимо не различаются. Значения  $\delta^{15}\text{N}$  достоверно отличаются между 4 парами выборок. На Северном Урале значения  $\delta^{15}\text{N}$  достоверно (уровень значимости 5%) больше в выборке возраста 1+ по сравнению с объединенной выборкой самцов и самок возраста 2+ и в объединенной выборке возраста 2+ по сравнению с объединенной выборкой полу-взрослых (3+, 4+) самцов и самок. На Среднем Урале значения  $\delta^{15}\text{N}$  достоверно (уровень значимости 1%) больше в выборке возраста 1+, чем в объединенной выборке полу-взрослых (+3, +4) и взрослых (>4+) самцов и самок. В объединенной выборке взрослых (>4+) самцов и самок со Среднего Урала значения  $\delta^{15}\text{N}$  достоверно (уровень значимости 5%) выше, чем в аналогичной выборке с Северного Урала.

Полученные данные показывают, что почти все значимые различия значений  $\delta^{15}\text{N}$  наблюдаются между выборками молодых особей (+1 и +2) или между выборкой молодых особей (2+) и полу-взрослых и взрослых (3+ и старше) особей. Различия в значениях  $\delta^{15}\text{N}$  определяются долей белковой пищи в питании [19]. Высокие значения  $\delta^{15}\text{N}$  в младших возрастных группах (0+, 1+) связаны с их молочной диетой, которая содержит большое количество белка. В возрасте 2+ животные переходят к самостоятельному питанию, но в коллагене костей сохраняется подпись от предыдущего периода молочного питания. Одна особь в возрасте 2+ имеет очень высокое значение  $\delta^{15}\text{N}$  – 11.3‰. Возможно, она продолжала питаться молоком на втором году жизни.

Имеются достоверно значимые географические различия между выборками взрослых особей. Значения  $\delta^{15}\text{N}$  у медведей Среднего Урала



**Рис. 1.** Распределение значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) в коллагене костей уральского пещерного медведя (*U. (S.) kanivetz*) Северного (синий цвет) и Среднего (красный цвет) Урала разного возраста и больших пещерных медведей Европы (*U. (S.) spelaeus s.l.*). Distribution of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) values in the collagen of the bones of the Ural cave bear (*U. (S.) kanivetz*) of the Northern (blue) and Middle (red) Urals of different ages and large European cave bears (*U. (S.) spelaeus s.l.*).

(4.5‰) больше, чем у медведей Северного Урала (3.9‰) на 0.6‰. Эти отличия указывают на различие диеты, в нашем случае – на разное соотношение растительной и мясной пищи. На Среднем Урале доля мясной пищи в структуре питания была выше, чем на Северном Урале, но это различие меньше различий между трофическими уровнями [20].

Распределение значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  в коллагене костей уральского пещерного медведя практически полностью совпадает с распределением  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  в коллагене костей пещерных медведей (*U. (S.) spelaeus* и *U. (S.) eremus*) Западной и Центральной Европы [1–7] (рис. 1). За пределами распределения находятся 3 особи, две из которых новорожденные (0+) и одна молодая (2+) особь с аномально высокой величиной  $\delta^{15}\text{N}$ . Это указывает на сходство диеты всех трех видов пещерных медведей – уральского (*U. (S.) kanivetz*) и европейских (*U. (S.) spelaeus* и *U. (S.) eremus*).

Анализ полученных данных показывает наличие значительных возрастных и географических

различий в значениях  $\delta^{15}\text{N}$  в коллагене костей уральского пещерного медведя Северного и Среднего Урала. Наблюдается значимый трофический сдвиг между возрастными группами, связанный с переходом от молочного питания к самостоятельному питанию. Имеются географические различия в питании взрослых особей на Северном и Среднем Урале. В составе диеты медведей Среднего Урала была выше доля мясной пищи. Различия значений  $\delta^{13}\text{C}$  между возрастными, половыми и географическими выборками не достоверны. В целом взрослые и полувзрослые самцы и самки Северного и Среднего Урала находятся на одном трофическом уровне, т.к. различия значений  $\delta^{13}\text{C}$  и  $\delta^{15}\text{N}$  (табл. 1, рис. 1) не превышают уровня различий между разными трофическими уровнями [20]. Большие пещерные медведи Урала и Европы имели сходный тип диеты.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01025, <https://rscf.ru/project/22-24-01025/>.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bocherens H.* Isotopic insights on cave bear palaeodiet // *Historical Biology*. 2019. V. 31. № 4. P. 410–421.
2. *Robu M., Fortin J.K., Richards M.P., et al.* Isotopic evidence for dietary flexibility among European Late Pleistocene cave bears (*Ursus spelaeus*) // *Canadian Journal of Zoology*. 2013. V. 91. № 4. P. 227–234.
3. *Bocherens H., Stiller M., Hobson K.A., et al.* Niche partitioning between two sympatric genetically distinct cave bears (*Ursus spelaeus* and *Ursus ingressus*) and brown bear (*Ursus arctos*) from Austria: Isotopic evidence from fossil bones // *Quaternary International*. 2011. V. 245. № 2. P. 238–248.
4. *Bon C., Berthouard V., Fosse P., et al.* Low regional diversity of late cave bears mitochondrial DNA at the time of Chauvet Aurignacian paintings // *Journal of Archaeological Science*. 2011. V. 38. № 8. P. 1886–1895.
5. *Pérez-Rama M., Fernández-Mosquera D., Grandal d'Anglade A.* Recognizing Growth Patterns and Maternal Strategies in Extinct Species Using Stable Isotopes: The Case of the Cave Bear *Ursus spelaeus* ROSEN-MÜLLER // *Quaternary International*. 2011. V. 245. № 2. P. 302–306.
6. *Münzel S.C., Stiller M., Hofreiter M., et al.* Pleistocene Bears in the Swabian Jura (Germany): Genetic replacement, ecological displacement, extinctions and survival // *Quaternary International*. 2011. V. 245. № 2. P. 225–237.
7. *Nejman L., Wood R., Wright D., et al.* Hominid Visitation of the Moravian Karst during the Middle-Upper Paleolithic Transition: New Results from Pod Hradem Cave (Czech Republic) // *Journal of Human Evolution*. 2017. V. 108. P. 131–146.
8. *Косинцев П.А., Симонова Г.В., Коновалова К.Ю.* Первые данные о питании уральского пещерного медведя (Mammalia, Carnivora, Ursidae, *Ursus (spelaeus) kanivetzi* Verestchagin, 1973) по результатам анализа изотопов  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 510. № 1. С. 288–291.
9. *Гимранов Д.О., Косинцев П.А.* Пещерные медведи (*Ursus spelaeus sensu lato*) Урала // Палеонтологический журнал. 2022. № 1. С. 97–106.
10. *Rabeder G., Hofreiter M., Nagel D., et al.* New taxa of alpine cave bears (Ursidae, Carnivora) // *Cahiers scientifiques-Museum d'histoire naturelle de Lyon*. 2004. V. 2. P. 49–68.
11. *Barlow A., Paijmans J.L.A., Federica A., et al.* Middle Pleistocene genome calibrates a revised evolutionary history of extinct cave bears // *Current Biology*. 2021. V. 31. № 8. P. 1771–1779.
12. *Гуслицер Б.И., Канивец В.И.* Пещеры пещорского Урала. М.–Л. Наука, 1965.
13. *Барышников Г.Ф.* Семейство медвежьих (Carnivora, Ursidae). СПб.: Наука, 2007. 542 с.
14. *Воробьев А.А.* Размеры длинных трубчатых костей большого пещерного медведя Среднего Урала // Современные проблемы популяционной, исторической и прикладной экологии: Материалы конференции. молодых ученых; 23–27 апреля 2001. Екатеринбург: “Екатеринбург”; 2001. С. 38–41.
15. *Воробьев А.А.* Этапы постнатального онтогенеза скелета большого пещерного медведя // Биота горных территорий: История и современное состояние: Материалы конференции молодых ученых; 15–19 апреля 2002 г. Екатеринбург: Академкнига; 2002. С. 22–28.
16. *Косинцев П.А., Воробьев А.А.* Биология большого пещерного медведя (*Ursus spelaeus* Ros. et Hein.) на Урале. Ю.А. Розанов (ред.). В кн.: Мамонт и его окружение: 200 лет изучения. М.: Геос; 2001. С. 266–278.
17. *Fosse P., Cregut-Bonnoure E.* Ontogeny/growth of (sub)modern brown bear (*Ursus arctos*) skeleton: A guideline to appraise seasonality for cave bear (*Ursus spelaeus*) sites? // *Quaternary International*. 2014. V. 339–340. P. 275–288.
18. *Liden K., Angerbjörn A.* Dietary change and stable isotopes: a model of growth and dormancy in cave bears. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences*. 1999. V. 266. P. 1779–1783.
19. *Chisholm B.S.* Variation in Diet Reconstructions Based on Stable Carbon Isotopic Evidence // *The Chemistry of Prehistoric Human Bone*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. P. 10–37.
20. *Bocherens H., Drucker D.* Trophic level isotopic enrichment of carbon and nitrogen in bone collagen: case studies from recent and ancient terrestrial ecosystems // *International J. of Osteoarchaeol.* 2003. V. 13. № 1–2. P. 46–53.

**CONTENT OF  $^{13}\text{C}$  AND  $^{15}\text{N}$  ISOTOPES IN BONE COLLAGEN  
OF GEOGRAPHICAL, AGE AND SEX GROUPS OF THE URAL CAVE BEAR  
(MAMMALIA, CARNIVORA, URSIDAE, URSUS (SPELAEARCTOS)  
KANIVETZ VERESTCHAGIN, 1973)**

**P. A. Kosintsev<sup>a,#</sup>, K. Yu. Konovalova<sup>a</sup>, and G. V. Simonova<sup>b</sup>**

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

<sup>b</sup>*Institute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems Siberian Branch Russian Academy of Sciences,  
Tomsk, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS V.N. Bolshakov

Data on the content of  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopes in the collagen of bones of the Ural cave bear (*Ursus (S.) kanivetz* Verestchagin, 1973) from the Northern and Middle Urals were analyzed. The bones date from the first half of MIS 3. The bones of newborn individuals, individuals at the age of 1 year, males and females at the age of 2 years, 3 years, 4 years and older than 4 years were studied. Differences in  $\delta^{13}\text{C}$  values between age, sex, and geographical samples are not significant. With age, the value of  $\delta^{15}\text{N}$  significantly decreases, which is associated with the transition from milk nutrition to independent nutrition. The proportion of meat food in the diet of adult bears in the Middle Urals was higher than in the diet of adult bears in the Northern Urals. There are no noticeable differences in isotope signatures between males and females of different ages. The large cave bears of the Urals and Europe had a similar type of diet.

*Keywords: Ursus kanivetz, Ural cave bear, Late Pleistocene, Ural, stable isotope,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , collagen*

УДК 577.214.5:575.174.015.3

## УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИНИЦИАЦИИ ЦВЕТЕНИЯ (*CONZ1*, *GIGZ1A*, *GIGZ1B*, *FKF1A*, *FKF1B*) В ПРОРОСТКАХ В УСЛОВИЯХ ДЛИННОГО ДНЯ РАЗЛИЧАЕТ РАННЕ- И ПОЗДНЕСПЕЛЫЕ ЛИНИИ *ZEА MAYS* L.

© 2023 г. Д. Х. Архестова<sup>1,2</sup>, О. К. Анисимова<sup>1</sup>, Е. З. Кочиева<sup>1</sup>, А. В. Щенникова<sup>1,\*</sup>

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 10.07.2023 г.

После доработки 02.08.2023 г.

Принято к публикации 04.08.2023 г.

Охарактеризовано 20 инбредных линий кукурузы *Zea mays* L. по длительности фенофаз, включая сроки цветения и спелости. Исследована экспрессия ключевых генов инициации цветения, *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b*, в проростках шести линий кукурузы, различающихся сроками спелости, в условиях длинного фотопериода. Выявлен существенно более низкий уровень транскриптов всех пяти генов у раннеспелых линий в сравнении с позднеспелыми образцами. Показана сходная экспрессия паралогичных генов *GIGZ1a* и *GIGZ1b*, а также значительное преобладание экспрессии *ZmFKF1a* в сопоставлении с паралогичным ему геном *ZmFKF1b*.

**Ключевые слова:** кукуруза, *Zea mays*, цветение, фотопериод, гены инициации цветения

**DOI:** 10.31857/S2686738923700385, **EDN:** XQDDEX

Наступление репродуктивной фазы развития у высших растений определяется циркадными ритмами, важным экологическим сигналом для установки которых служит фотопериодизм. Показания биологических часов сопоставляются со световыми сигналами, и растение зацветает при длинном фотопериоде (более 12 ч; длиннодневные виды), коротком фотопериоде (короткодневные) или независимо от длины фотопериода (нейтральные; однако количество цветков обусловлено соотношением дня и ночи). Важным компонентом основного циркадианного осциллятора (эндогенные часы) считается транскрипционный фактор (ТФ) GIGANTEA (GI). На примере модельного длиннодневного вида *Arabidopsis thaliana* L. показано, что белок GI совместно с рецептором синего света FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) стимулируют экспрессию гена ТФ CONSTANS (CO), индуктора цветения растения при длинном дне [1]. Это

происходит благодаря тому, что комплекс GI/FKF1 способствует деградации транскриптов ТФ CYCLING DOF FACTOR 1 (*CDF1*), *CDF2* и *CDF3*, участвующих в репрессии *CO* [2, 3]. Помимо регуляции времени цветения, GI и FKF1 имеют и другие, не менее важные функции. Активность рецептора FKF1 критична для фотоморфогенеза [4]. ТФ GI играет множество ролей, включая участие в передаче световых и гормон-опосредованных сигналов, удлинении гипокотилия, накоплении крахмала и хлорофиллов, транспирации, устойчивости к стрессам (гербицидам, холоду, засухе и избытку соли) [5–7]. Однако наиболее значимой функцией ТФ GI считается поддержание корректного циркадного периода у растения путем регуляции протеасомозависимой деградации другого центрального циркадианного осциллятора TIMING OF CAB EXPRESSION 1 [5, 8].

Кукуруза (*Zea mays* L.) является результатом доместикации теосинте (*Z. mays* ssp. *parviglumis*), растения короткого дня [9]. Дальнейшая селекция культуры способствовала появлению разнообразия реакций данного вида на продолжительность фотопериода, и современные образцы кукурузы считаются нейтральными, т.е. нечувствительными к фотопериоду в отношении цветения. Тем не менее задержка цветения и изменения в соцветии при длинном дне свидетельствуют о сохранении важности фотопериода для кукурузы при переходе к репродуктивной стадии развития [10]. Консерва-

<sup>1</sup>Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт сельского хозяйства, филиал Кабардино-Балкарского научного центра Российской академии наук, Нальчик, Россия

\*e-mail: shchennikova@yandex.ru

**Таблица 1.** Характеристики линий, отобранных для анализа генной экспрессии

Линия	Срок спелости	Фаза всходы-цветение/вегетационный период, дни	Сумма активных температур	Сумма эффективных температур	Группа спелости по ФАО
L1	Раннеспелая	39/80	2200	900–1000	100–199
L2	Очень позднеспелая	72/165	3200	1300	600–699
L3	Позднеспелая	63/150	2800	1200	400–499
L4	Раннеспелая	50/90	2200	900–1000	100–199
L5	Очень позднеспелая	72/165	3200	1300	600–699
L6	Средне-позднеспелая	57/130	2600	1150	300–399

тивность фоточувствительного механизма регуляции перехода к репродуктивной фазе подтверждается наличием в геноме кукурузы генов *CONSTANS of Zea mays 1 (CONZ1)*, *GIGANTEA of Zea mays 1 A и B (GIGZ1a, GIGZ1b)*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* [1, 2].

При коротком дне пик экспрессии *CONZ1* приходится на ночь, тогда как днем транскрипция гена стремится к нулю. При длинном дне паттерн “день–ночь” существенно менее упорядочен, однако тоже подвержен суточным колебаниям, что говорит о способности современных сортов, линий и гибридов кукурузы различать изменения фотопериода, несмотря на декларируемую нечувствительность к ним у вида с точки зрения цветения [1]. Предполагается также, что такой паттерн экспрессии гена может характеризоваться как рудиментарный, т.е. активность гена больше не оказывает существенного влияния на цветение кукурузы, либо фотопериод продолжает воздействовать на переход к репродуктивному развитию, но не столь очевидно, как у предшественника кукурузы – теосинте [1]. Кроме того, чувствительность кукурузы к фотопериоду может сглаживаться при регуляторном включении автономного пути цветения [1].

Гены *GIGZ1a* и *GIGZ1b* имеют либо практически идентичные паттерны экспрессии [1], либо *GIGZ1a* экспрессируется сильнее, чем *GIGZ1b* [11]. Независимо от фотопериода максимум транскриптов *GIGZ1a* и *GIGZ1b* приходится на световую фазу, предшествующую индукции транскрипции *CONZ1* [1]. При длинном фотопериоде пик наивысшей экспрессии *GIGZ1a* и *GIGZ1b* наблюдается позже, чем в условиях короткого дня. Кроме того, появляется дополнительный пик в суточных колебаниях *CONZ1*, который не коррелирует с паттерном генов *GIGZ1* и за индукцию которого могут отвечать гены рецептора синего света *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* [1]. Предполагается, что белки *ZmFKF1* образуют комплекс с *GIGZ1*, и этот комплекс способствует деградации транскриптов *CDF*, участвующих в репрессии *CONZ1*, как это продемонстрировано для *A. thaliana* [2, 3].

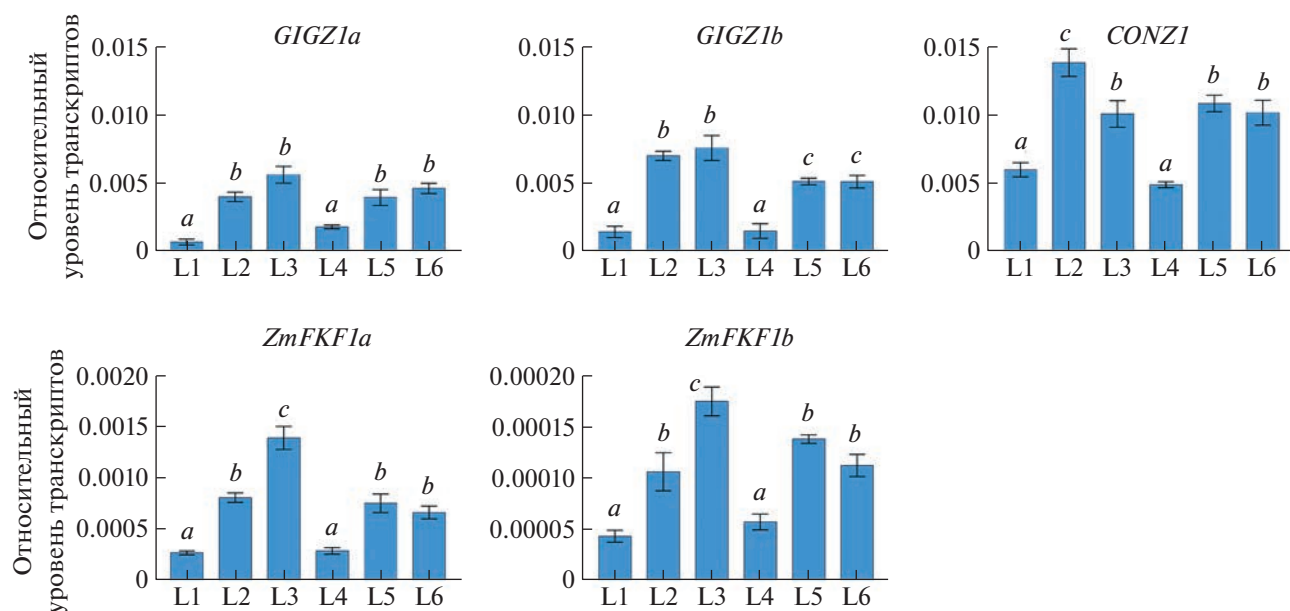
В связи со сказанным, оказывается неожиданным, что, как было показано, выключение одного из двух генов *GIGZ1* не замедляет, а ускоряет наступление цветения кукурузы в условиях длинного дня [11, 12].

Целью данного исследования стал поиск возможной зависимости уровня экспрессии генов *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* в условиях длинного фотопериода от сроков инициации цветения образцов инбредных линий кукурузы, контрастных по условному индексу скороспелости ФАО (ФАО).

В работе были использованы 20 линий кукурузы селекции Института сельского хозяйства (ИСХ) КБНЦ РАН. По 10 образцов каждой линии были высеяны в середине мая 2022 г. в поле ИСХ (КБР, 43°35' с. ш.) и охарактеризованы по категориям ФАО (включая продолжительность периода вегетации, сумму эффективных температур и ряд других факторов) в режиме длинного дня (май–июль в КБР характеризуется 14–15 ч днем).

Было показано, что женские соцветия (будущий початок) у образцов начинают цвести в период с третьей декады июня по третью декаду июля. Определение длительности фенологических фаз позволило охарактеризовать две линии как раннеспелые, две линии как очень позднеспелые, и оставшиеся 16 линий как разные варианты позднеспелости. Для дальнейшего анализа были выбраны 6 линий, представляющие три основные контрастные группы спелости: по две линии с ФАО 100–199 (раннеспелые), 300–400 (позднеспелые) и 600–699 (очень позднеспелые) соответственно (табл. 1).

Зерна отобранных шести линий кукурузы, собранные в 2022 г., проращивали в 2023 г. в увлажненной почве, в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК ФИЦ биотехнологии РАН) при длинном фотопериоде (день/ночь: 16/8 ч, 23°C/25°C) до стадии образования 4 листьев. Листовой материал проростков использовали для определения уровня экспрессии генов *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b*. Тканевые пробы отбирали спустя 4 ч



**Рис. 1.** Уровень экспрессии генов *CONZ1* (NCBI Gene ID 100147736), *GIGZ1a* (100147733), *GIGZ1b* (100272803), *ZmFKF1a* (100383277) и *ZmFKF1b* (100279726) в листе проростка образцов шести линий (L1–L6) кукурузы *Z. mays*, различающихся по срокам спелости, спустя 4 ч после рассвета (длинный фотопериод). Использованные праймеры: *CONZ1* (5'-GGT-CAGTGTCTTACACAGATTCC-3' и 5'-TGTCTGTCTGTCGTTGCCATGTTGTC-3'); *ZmFKF1a* (5'-TCAACGCCGCTTCGAGG-3' и 5'-GGGTGTGCGCCTTTGGGCAT-3'); *ZmFKF1b* (5'-GTCATATACGTCAACGCCGCA-3' и 5'-GATGTCGCCTCTGG-GTCT-3'); *GIGZ1a* (5'-CAGTTTACAGCTGACACCGATCAA-3' и 5'-GCTCCGGATGATGAAGAACAAG-3'); *GIGZ1b* (5'-AGTGAGCAGTTCCTGAAGATG-3' и 5'-GCTCCGGATGATGAAGAACAAG-3'). Референсный ген – *Zea mays polyubiquitin* (NM\_001329666.1; 5'-ATCGTGGTTGTGGCTTCGTTG-3' и 5'-GCTGCAGAAGAGTTTTGGGTACA-3'). Результаты РВ-ПЦР статистически обработаны (one-way ANOVA) с помощью Graph Pad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США) на основе двух биологических и трех технических повторов ( $p$ -value < 0.05 для значимых различий в экспрессии гена). Над столбцами буквами “а”, “b” и “с” обозначено объединение образцов по кластерам со статистически сходной генной экспрессией.

после начала световой фазы. Выбор временной точки был основан на данных о суточных колебаниях уровня экспрессии генов *CONZ1*, *GIGZ1a* и *GIGZ1b* при длинном дне: в рассветные часы экспрессия *CONZ1* идет на спад, а *GIGZ1a* и *GIGZ1b* – на подъем [1]. Также было учтено, что ассоциация белков FKF1 и GI, необходимая для индукции гена *CO*, происходит под воздействием света и разрушается в темноте [13].

Из 50 мг ткани листа выделяли суммарную РНК с дополнительной очисткой от геномной ДНК (RNeasy Plant Mini Kit и RNase free DNasey set, QIAGEN, Германия), синтезировали кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США), концентрацию препаратов кДНК определяли флуориметрически (Qubit 4, Thermo Fisher Scientific, США) и 3 нг кДНК использовали для анализа генной экспрессии с помощью количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Реакцию проводили с набором “Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия) в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США); программа: 5 мин 95°C; 40 циклов (15 с 95°C; 50 с 62°C).

В результате было показано, что образцы обеих раннеспелых линий характеризуются существенно более низким уровнем транскриптов анализируемых генов в сравнении с поздними линиями (рис. 1). При этом степень позднеспелости не коррелирует с разницей в активности генов. Таким образом, несмотря на то, что продукты генов *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* считаются индукторами цветения, их активность в проростках на стадии четвертого листа рано цветущих линий оказалась ниже, чем у поздно цветущих образцов (рис. 1). Возможно, это связано с тем, что в анализе использовали именно вегетативные ткани на ранних стадиях развития растений, а не взрослых растений перед стадией цветения.

Полученные результаты согласуются с упомянутым выше эффектом выключения одного из двух генов *GIGZ1*. Как упоминалось выше, мутации в одном из генов, как *zmgi1*, так и *zmgi2*, ускоряют цветение кукурузы в условиях длинного дня; при этом повышается экспрессия *CONZ1*, на основании чего делается вывод о подавляющей роли данных генов [11, 12]. Поскольку двойная мутация *zmgi1 zmgi2* не изучалась, эффект одиночных мутаций может свидетельствовать о возможном росте индуцирующей цветение

активности второго, невыключенного паралога *GIGZ1*. В соответствии с данными [1], где *GIGZ1a* и *GIGZ1b* экспрессируются одинаково, и в отличие от данных [11], где уровень транскриптов *GIGZ1a* выше, чем у *GIGZ1b*, в данной работе гены *GIGZ1a* и *GIGZ1b* показывали одинаковый (между линиями, и по уровню транскриптов) тип экспрессии (рис. 1). Это предполагает равное участие генов в выполнении функций *GI* и способность равноценного замещения друг друга при выключении одного из паралогов. В противоположность эффекту мутаций *zmg1*, у вида *A. thaliana* выключение *GI* (один ген в отличие от двух паралогов у кукурузы) приводит к замедлению цветения, что подтверждает роль *GI* как индуктора цветения [13].

То, что *A. thaliana* является длиннодневным растением, а кукуруза — нейтральным или близким к растениям короткого дня, дополнительно свидетельствует в пользу возможной подавляющей цветение функции *GIGZ1* в условиях длинного дня. То есть низкий (в сравнении с поздними линиями) уровень транскриптов *GIGZ1* у раннеспелых линий кукурузы (рис. 1) может быть причиной их раннего цветения. Однако экспрессия других трех генов индукторов цветения (*CONZ1*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b*) у ранних линий кукурузы также ниже, чем у поздних линий (рис. 1). Это не согласуется с выводом об угнетающей цветение функции *GIGZ1*. В этом случае активность генов *CONZ1*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* пришлось бы интерпретировать аналогичным *GIGZ1* образом, хотя ранее было показано, что и *CONZ1*, и *ZmFKF1* положительно ассоциированы с активацией цветения кукурузы [1, 2]. Отметим также, что уровень экспрессии *ZmFKF1b* был на порядок ниже, чем уровень транскриптов *ZmFKF1a* (рис. 1) несмотря на то, что именно генетический локус *ZmFKF1b* сыграл ключевую роль в адаптивной эволюции цветения женского соцветия кукурузы [2].

Поскольку исследование проводилось на вегетативных проростках, а не на растениях при переходе к репродуктивной стадии развития, при интерпретации результатов нужно учитывать и другие возможные функции *ZmFKF1* и *GIGZ1*, кроме регуляции времени цветения. Активность генов *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* в фотоморфогенезе (подобно *FKF1* [9]), а генов *GIGZ1* — с ролью ТФ *GIGZ1a* и *GIGZ1b* в сигнальных путях, росте гипокоты, поддержании циркадного цикла и других процессах (подобно *GI* [5, 6, 8]). Поэтому с учетом сказанного и результатов РВ-ПЦР (рис. 1) невозможно однозначно судить об угнетающей или стимулирующей цветение роли генов *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b*. Тем не менее наблюдаемую существенную разницу в уровне экспрессии генов между ранними и поздними ли-

ниями (рис. 1) можно связать со сроками скороспелости кукурузы и, после подтверждения ассоциации на большем количестве образцов, использовать для отбора доноров признака раннеспелости.

Таким образом, охарактеризованные по срокам цветения инбредные линии кукурузы были проанализированы на предмет уровня экспрессии генов, кодирующих ключевые индукторы цветения, в условиях длинного фотопериода (4 ч после начала дня). Было обнаружено, что ранние линии отличаются от позднеспелых образцов кукурузы пониженным уровнем транскриптов всех проанализированных генов *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a* и *ZmFKF1b* в проростках на стадии четвертого листа. Паралогичные гены *GIGZ1a* и *GIGZ1b* экспрессировались на одинаковом уровне, в то время как количество мРНК *ZmFKF1b* было на порядок ниже, чем в случае паралогичного гена *ZmFKF1a*. Можно предположить, что уровень экспрессии генов *CONZ1*, *GIGZ1* и *ZmFKF1* в проростках в условиях длинного дня может служить маркером времени инициации цветения кукурузы.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-16-00008 (постановка эксперимента, анализ экспрессии генов) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (фенотипирование линий кукурузы).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller T.A., Muslin E.H., Dorweiler J.E. // *Planta*. 2008. V. 227 (6). P. 1377–1388.
2. Liu L., Wu Y., Liao Z., et al. // *Heredity* (Edinb). 2018. V. 120 (4). P. 310–328.
3. Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A., et al. // *Science*. 2007. V. 318. P. 261–265.
4. Kami C., Lorrain S., Hornitschek P., et al. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2010. V. 91. P. 29–66.
5. Mishra P., Panigrahi K.C. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 8.
6. Ronald J., McCarthy K., Davis S.J. // *Mol. Plant*. 2020. V. 13 (3). P. 357–359.
7. Ke Q., Kim H.S., Wang Z., et al. // *Plant Biotechnol. J.* 2017. V. 15 (3). P. 331–343.
8. Kim W.Y., Fujiwara S., Suh S.S., et al. // *Nature*. 2007. V. 449. P. 356–360.
9. Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99 (9). P. 6080–6084.
10. Chen Q., Zhong H., Fan X.W., et al. // *Plant, Cell & Environment*. 2015. V. 38 (8). P. 1479–1489.
11. Bendix C., Mendoza J.M., Stanley D.N., et al. // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36 (7). P. 1379–1390.
12. Li Z., Gao F., Liu Y., et al. // *Plant Sci*. 2023. V. 332. P. 111701.
13. Rubio V., Deng X.W. // *Science*. 2007. V. 318 (5848). P. 206–207.



**EXPRESSION LEVEL OF FLOWERING TIME GENES  
(*CONZ1*, *GIGZ1A*, *GIGZ1B*, *FKF1A*, *FKF1B*) IN SEEDLINGS UNDER LONG DAY  
CONDITIONS DIFFERENTIATES EARLY AND LATE *ZEA MAYS* L.**

**D. Kh. Arkhestova<sup>a,b</sup>, O. K. Anisimova<sup>a</sup>, E. Z. Kochieva<sup>a</sup>, and A. V. Shchennikova<sup>a,#</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Bioengineering, Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Institute of Agriculture, Branch of Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,  
Nalchik, Russian Federation*

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

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

Twenty inbred lines of maize *Zea mays* L. were characterized by the duration of phenophases, including the timing of flowering and ripeness. The expression of key genes for initiation of flowering, *CONZ1*, *GIGZ1a*, *GIGZ1b*, *ZmFKF1a*, and *ZmFKF1b*, was studied in seedlings of six maize lines with different ripeness periods under long photoperiod conditions. A significantly lower level of transcripts of all five genes was found in early ripening lines in comparison with late ripening accessions. A similar expression of the paralogous *GIGZ1a* and *GIGZ1b* genes was shown, as well as a significant predominance of *ZmFKF1a* expression in comparison with its paralogous gene *ZmFKF1b*.

*Keywords:* maize, *Zea mays*, flowering, photoperiod, flowering initiation genes

УДК 577.115.3: 597.552.511:639.07:591.3

## СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ОБЩИХ ЛИПИДОВ У ПЕСТРЯТОК И СМОЛТОВ АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L., ВЫРАЩЕННЫХ В АКВАКУЛЬТУРЕ ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ ОСВЕЩЕНИЯ

© 2023 г. Д. С. Провоторов<sup>1,\*</sup>, С. А. Мурзина<sup>1,\*\*</sup>, В. П. Воронин<sup>1</sup>,  
А. Е. Курицын<sup>1</sup>, академик РАН Н. Н. Немова<sup>1</sup>

Поступило 25.08.2023 г.

После доработки 07.09.2023 г.

Принято к публикации 08.09.2023 г.

В рамках настоящего исследования поставлен эксперимент по введению постоянного искусственного освещения (24LD) в стандартную технологию выращивания молоди лососевых в условиях, характерных для южного региона (Республика Северная Осетия-Алания) и его влиянию на состав жирных кислот (ЖК) общих липидов в мышцах и печени у пестряток и смолтов атлантического лосося *Salmo salar* L. Установлено, что ЖК-спектр рыб характеризуется изменением ключевых ЖК-факторов, свидетельствующих о полноценном завершении смолтификации и готовности смолтов к новым условиям обитания: значительным увеличением содержания полиеновых ЖК (ПНЖК) за счет  $(n-3)$  ПНЖК, а в них ЖК “морского” типа –  $22:6(n-3)$ , высокими значениями соотношений  $(n-3)/(n-6)$  ПНЖК,  $22:6(n-3)/18:3(n-3)$ . Наиболее показательные изменения отмечены в мышцах, и для всех экспериментальных групп установлено, что снижение насыщенных ЖК (НЖК) и повышение общей ненасыщенности липидов происходит в первую очередь именно за счет ПНЖК, в то время как моноеновых ЖК снижается наряду с НЖК. Данные экспериментальных исследований липидного и жирнокислотного состава молоди лосося, а также более высокая доля смолтов в исследуемых группах рыб свидетельствуют о том, что наиболее успешно процесс смолтификационной перестройки происходил в группах с постоянным освещением и круглосуточным кормлением и естественным режимом освещения и кормления.

**Ключевые слова:** жирные кислоты, онтогенез, адаптация, свет, кормление, аквакультура

**DOI:** 10.31857/S2686738923700397, **EDN:** XPKZCR

### ВВЕДЕНИЕ

Атлантический лосось (*Salmo salar*) – один из наиболее ценных объектов аквакультуры. Одним из значимых этапов его жизненного цикла является смолтификация, в ходе которой происходит комплекс морфофизиологических, биохимических и поведенческих модификаций организма молоди [1, 2], чем достигается смена среды обитания с пресной на морскую. Наступление смолтификации зависит от различных факторов, включая условия освещения. Известно, что изменение продолжительности периода освещения может

стимулировать процессы смолтификации, при этом необходимо использование так называемых “зимних” (коротких) режимов фотопериода – последовательное чередование режимов фотопериода “лето–зима–лето” с уменьшением продолжительности зимнего периода освещения (“зимнее окно”) [3–5].

Организм в процессе роста и развития способен накапливать и модифицировать жирные кислоты, и они сравнительно быстро реагируют на изменение условий среды, в том числе на световой режим. В рамках настоящего исследования поставлен эксперимент по введению постоянного искусственного освещения (24LD) в стандартную технологию выращивания молоди в условиях, характерных для южного региона (Республика Северная Осетия-Алания). Ранее [6, 7] было изучено изменение липидного статуса молоди (пестряток и смолтов) лосося при воздействии совокупного действия разных режимов фотопериода и кормления в летне-осенний период. Было пока-

<sup>1</sup>Институт биологии – обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Федерального исследовательского  
центра “Карельский научный центр Российской  
академии наук”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: klaydim1@mail.ru

\*\*e-mail: murzina.svetlana@gmail.com

зано, что стимулирующий подготовку к смолтификации сеголеток атлантического лосося эффект в большей степени достигался при использовании круглосуточного освещения. Данная работа дополняет эти исследования сведениями по изменению жирнокислотного статуса у пестряток и смолтов лосося в процессе смолтификации при введении круглосуточного освещения и кормления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование влияния фотопериода на рост и развитие молоди атлантического лосося проводили на предприятии ООО “Остров аквакультура” (Республика Северная Осетия-Алания). Условия эксперимента и его особенности описаны в наших недавних публикациях [5, 6]. Кратко: для стимуляции эндогенных механизмов, влияющих на ростовые процессы, во все бассейны с сеголетками (после перехода на экзогенное питание) было установлено непрерывное освещение (24LD) с использованием светодиодных осветителей LED (36W, 6500K). В августе сеголеток средней массой 2.3 г пересадили в выростные лотки размером 4 × 1.2 м, объемом 2.5–2.7 м<sup>3</sup>, в количестве 4900 особей/лоток. С начала сентября сеголеток разделили на три группы по 2 лотка и стали содержать в следующих (экспериментальных) условиях: группа “24LD+КК” – режим освещения постоянный (24LD), кормление круглосуточное (КК); группа “ЕстLD+КД” – естественное освещение (ЕстLD), кормление проводится в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре), через каждые два часа (КД); группа “24LD+КД” – режим освещения постоянный (24LD), кормление проводится только в светлое время суток как у рыб из опыта № 1 (КД).

С начала декабря подростую молодь, согласно экспериментальным группам, перенесли в круглые бассейны объемом 2.1 м<sup>3</sup> (диаметром 2 м, высотой 1 м) в количестве в среднем 2800 на бассейн. С декабря по январь дополнительное освещение не применялось – упомянутое выше “зимнее окно”. Далее выращивание пестряток и смолтов проходило в условиях естественного освещения региона. Условия дневного освещения освещения: 5500 lx, в пасмурную погоду – 500 lx.

В эксперименте использовали коммерческий корм марки Scretting Nutra HP (Италия) фракция 1.8 (с ноября по февраль) и BioMag Эфико Альфа 790 (Дания) фракция 3 (с февраля по март), оба корма схожи по составу и пищевой ценности; расчет корма проводили согласно нормам возрастной группы и с учетом биомассы. Отход за период с декабря по март составил 26, 42 и 34% особей в группах 24LD+КК, ЕстLD+КД и 24LD+КД соответственно.

Общая средняя масса рыб (пестрятки вместе со смолтами) на 2 марта составила  $59.44 \pm 3.45$ ,  $57.71 \pm 5.22$ ,  $53.88 \pm 4.52$  в группе 24LD+КК, группе ЕстLD+КД и группе 24LD+КД соответственно. Количество смолтов в исследуемых группах на день анализа (3 марта) составило: в группе “24LD+КК” – до 50%, “ЕстLD+КД” – 40%, “24LD+КД” – 25%. Для исследования отбирали пестряток и смолтов лосося в начале марта (отбор особей проводили из каждой группы, которые на этапе развития сеголеток подвергались дополнительному освещению).

Жирнокислотный состав общих липидов оценивали в мышцах и печени рыб индивидуально (у каждой особи) по содержанию отдельных жирных кислот и их соотношений с использованием метода газовой хроматографии [6].

Исследования выполнены на базе лаборатории экологической биохимии и с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФИЦ “Карельский научный центр Российской академии наук”.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка программирования “R” (v. 3.6.1.) в среде разработки “RStudio” с применением дополнительных пакетов: “readxl” (v. 1.3.1), “tidyverse” (v. 1.3.0), “ggplot2” (v. 3.4.0) “pheatmap” (v. 1.0.12). Для описания количественного содержания индивидуальных липидных классов и суммарных семейств жирных кислот были рассчитаны параметры описательной статистики (среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического) с группировкой по месяцам и типу экспериментального освещения. Отличия исследованных показателей между пестрятками и смолтами считались достоверными при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Жирнокислотный профиль мышц пестряток и смолтов атлантического лосося*

В мышцах пестряток и смолтов доминировали полиненасыщенные ЖК (ПНЖК), количество которых у пестряток группы “24LD+КК” составило 43.24%, у рыб группы “ЕстLD+КД” – 35.07% и у группы “24LD+КД” – 38.12%, а у смолтов – 47.95, 46.02 и 49.08% соответственно. Превалирование суммарных ПНЖК проходило за счет ( $n=3$ ) ПНЖК: у пестряток содержание этих кислот было в пределах 28.53–34.91%, у смолтов – 40.0–42.72%. Среди ( $n=3$ ) ПНЖК высокое содержание было установлено для докозагексаеновой кислоты, ДГК (у пестряток – до 17.87% и у смолтов – до 30.85%). Показано, что содержание ДГК у смолтов всех экспериментальных вариантов по сравнению с пестрятками (достоверное для группы “ЕстLD+КД”) было выше. Достоверных отличий в ЖК профиле между экс-

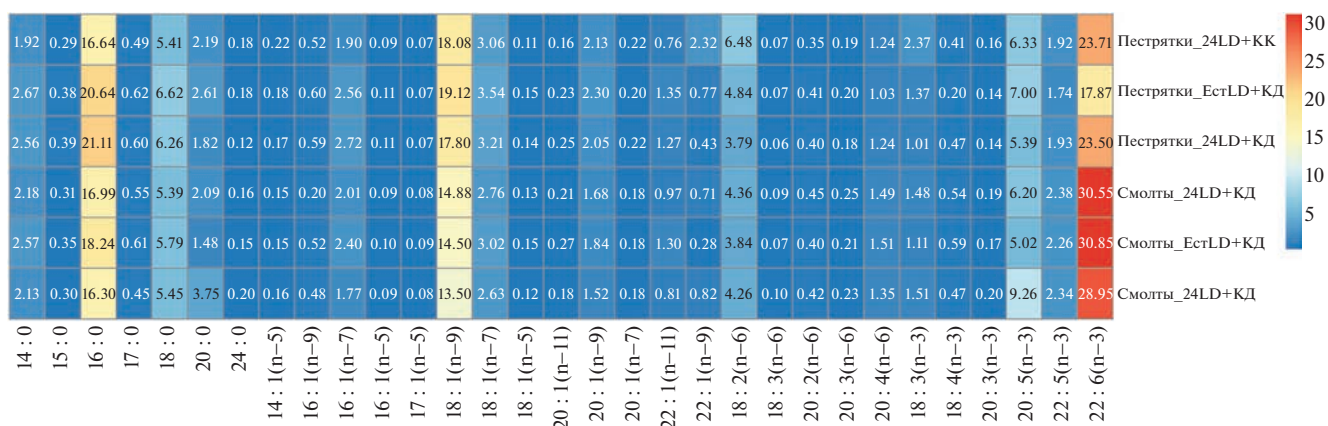


Рис. 1. Тепловая карта содержания отдельных жирных кислот (% суммы ЖК) в мышцах молоди атлантического лосося в трех исследованных экспериментальных вариантах в марте.

периментальными группами у пестряток и у смолтов не обнаружено.

Содержание ( $n=6$ ) ПНЖК у исследуемой молоди (пестряток и смолтов) было значительно ниже и в пределах 5.67–8.33%, при этом у смолтов из всех экспериментальных групп не наблюдалось значимого тренда к изменению этих ЖК. Доминирующими по количеству кислотами являлись линолевая кислота 18:2( $n=6$ ) (3.79–6.48%), которая у смолтов группы “ЕстLD+КД” достоверно снижалась по сравнению с пестрятками (до 3.84%), а также арахидоновая кислота 20:4( $n=6$ ) (до 1.51%), содержание которой достоверно возрастает у смолтов этой же группы (до 1.51%). При этом отмечено, что соотношение 20:4( $n=6$ )/18:2( $n=6$ ), которое указывает на соотношение продукта биосинтеза, полученного из предшественника в ходе последовательных реакций ( $n=6$ ) ПНЖК, и эффективность конвертации 18:2( $n=6$ ) → 20:4( $n=6$ ) достоверно выше именно для смолтов группы “ЕстLD+КД”.

Содержание НЖК у исследуемых рыб было в пределах 27.12–33.74%, с доминированием пальмитиновой кислоты 16:0 (16.3–31.1%). Не установлено достоверных отличий содержания НЖК между экспериментальными группами пестряток и смолтов, однако показано, что у смолтов содержание НЖК меньше.

Содержание МНЖК у исследованной молоди (пестряток и смолтов) было в пределах от 22.33 до 31.19%, при этом установлен тренд к снижению этих ЖК у смолтов по сравнению с пестрятками для всех экспериментальных групп (достоверно только для рыб группы “24LD+КД”). Снижение количества МНЖК происходило за счет доминирующей олеиновой кислоты 18:1( $n=9$ ), содержание которой у пестряток было в пределах 17.8–19.12%, в то время как у смолтов – 13.5–14.88%. Среди других МНЖК отмечено значимое содер-

жание 18:1( $n=7$ ) (2.63–3.54%), 16:1( $n=7$ ) (1.77–2.72%) и 20:1( $n=9$ ) (1.52–2.3%).

#### Жирнокислотный профиль печени пестряток и смолтов атлантического лосося

В жирнокислотном профиле печени рыб (пестряток и смолтов) так же, как и в мышцах, доминировали ПНЖК (44.39–46.3%), при этом не выявлено значимых изменений и отличий между экспериментальными группами у пестряток и смолтов; самое высокое количество ( $n=3$ ) ПНЖК (30.36–36.18%). Достоверная динамика выявлена только для смолтов группы “24LD+КД” (достоверное снижение от 34.58 до 30.36%). Не установлено достоверной динамики мажорной ДГК (22.3–27.73%) от пестряток к смолтам.

Содержание  $n=6$  ПНЖК было в диапазоне от 10.12 до 14.03%, при этом у молоди группы “24LD+КД” выявлено достоверное их увеличение от пестряток к смолтам (от 10.91 до 14.04%). Доминирующая кислота – 18:2( $n=6$ ) (5.42–8.39%), при этом в печени рыб этой же группы, ее значение достоверно возрастает с 6.22 до 8.39% от пестряток к смолтам.

Содержание МНЖК в печени пестряток и смолтов атлантического лосося было в пределах 24.88–32.95%, при этом выявлено достоверное увеличение таковых у смолтов в группе “24LD+КД”. Так же, как и в мышцах, преобладала 18:1( $n=9$ ) (17.54–24.97%). Среди других кислот данного семейства можно отметить значимое содержание 18:1( $n=7$ ), 20:1( $n=9$ ), 16:1( $n=7$ ) (рис. 2).

Содержание НЖК в печени пестряток и смолтов было в пределах от 22.66 до 28.82%. Выявлено достоверное снижение данного показателя у смолтов группы “24LD+КД” от 27.97 до 22.66%. Среди НЖК выявлено преобладание 16:0 (14.18–8.81%), при этом у смолтов группы “24LD+КД” содержание данной кислоты достоверно снижается.

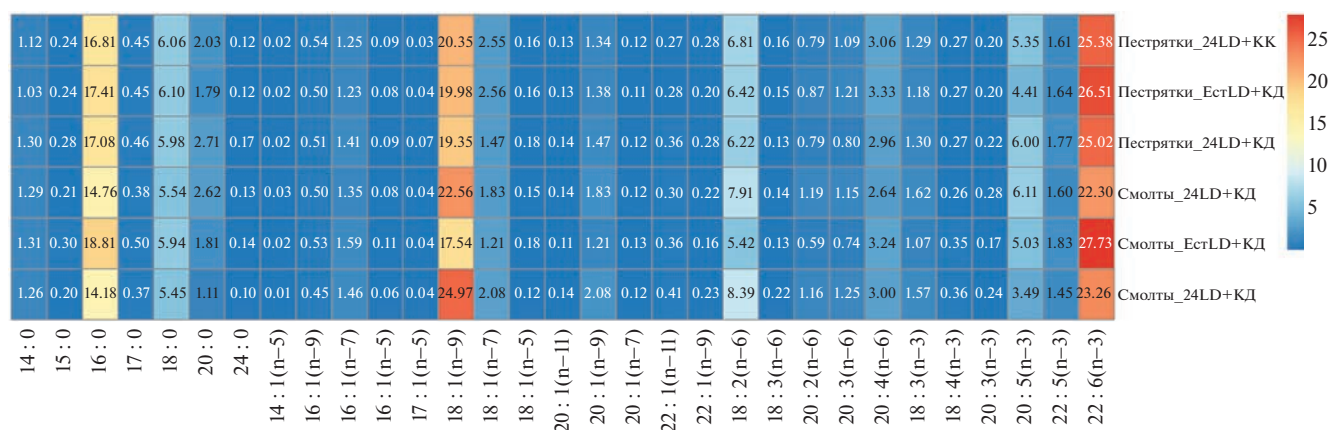


Рис. 2. Тепловая карта содержания и динамики отдельных жирных кислот (% суммы ЖК) в печени молоди атлантического лосося в трех исследованных экспериментальных вариантах в марте.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что в марте, после так называемого “зимнего окна” в мышцах и печени пестряток и смолтов лосося всех трех экспериментальных групп преобладают ПНЖК за счет  $(n-3)$  ПНЖК, которых относят к так называемому “морскому” типу. При этом в мышцах смолтов увеличивается содержание ДГК, что обычно связывают с повышением двигательной активности рыб, что характерно и для смолтов лосося.

Необходимо отметить, что повышение содержания  $(n-3)$  ПНЖК происходит на фоне снижения содержания МНЖК и НЖК в мышцах рыб всех экспериментальных групп. Эти данные, как это было показано ранее, указывают на трансформацию липидного метаболизма лосося при смолтификации. Отметим, что в первой части эксперимента [6] наиболее явный тренд к увеличению содержания  $(n-3)$  ПНЖК мы наблюдали именно у рыб группы “24LD+КК”, как и в целом наиболее четкие и устойчивые тренды к “подготовке” липидного метаболизма и его модификации с “пресноводного” типа на “морской”.

Показано небольшое содержание (1–2%) незаменимой 18:3( $n-3$ ) как в мышцах, так и печени пестряток и смолтов. Известно [8], что низкое количество этой кислоты характерно для заводской молоди, которая питается высоко сбалансированными кормами с достаточным содержанием ДГК (“морское” сырье) лосося по сравнению с дикой, у которой происходит более интенсивное накопление данной кислоты. Недостаток незаменимой 18:3( $n-3$ ) “компенсируется” повышенным содержанием ДГК, так как известно, что ДГК и ЭПК более интенсивно стимулируют рост мышц у рыб, по сравнению с 18:3( $n-3$ ), и в целом обладают большей биологической ценностью [9–11]. Кроме того, это может быть связано со стимуляцией фотопериодом ферментативной системы конвертации  $n-3$  кислот, в ходе которой 18:3( $n-3$ )

через ряд промежуточных продуктов превращается в ДГК, о чем упоминалось в нашей более ранней работе [6]. Следует отметить, что семейство  $(n-6)$  ПНЖК в количественном содержании значительно уступает  $n-3$  ПНЖК, особенно в мышцах рыб группы “24LD+КК”. При этом необходимо отметить некоторое увеличение в мышцах смолтов содержания арахидоновой кислоты (20:4( $n-6$ )) по сравнению с первым этапом эксперимента (сеголетки) [6] во всех группах. Известно [8, 12], что у молоди лосося, выращиваемой в аквакультуре, происходит аккумуляция поступающей с пищей исходной кислоты данного семейства – 18:2( $n-6$ ), а накопление 20:4( $n-6$ ) затруднено по сравнению с дикой молодью. В печени пестряток содержание арахидоновой кислоты достигает порядка трех процентов, и у смолтов остается на том же уровне. Небольшое (по сравнению с дикой рыбой), но “уверенное” накопление арахидоновой кислоты может играть немаловажную роль в процессе приспособления к новым условиям обитания, поскольку она является предшественником ряда биологически активных веществ, таких как простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, необходимых для полноценной адаптации организма рыб. Например, изменение количества простагландина F, одного из эндогормонов, регулирует поступление  $Ca^{2+}$  в клетку [13]. Вероятно, различие в экспериментальных режимах освещения не оказывает влияния на изменение содержания арахидоновой кислоты у молоди лосося.

В печени изменения основных классов жирных кислот имеет некоторые отличия (специфические) от таковых в мышцах. В печени смолтов также преобладают  $n-3$  ПНЖК. При сравнении изменений ЖК общих липидов в печени рыб из групп “24LD+КК” и “ЕстLD+КД” не установлено достоверных изменений, что может указывать на функционирование органа в состоянии фи-

зиологической нормы и отсутствии реакции/влияния освещения и кормления на показатели в данном органе. Наибольшая по количеству ДГК характеризовалась отсутствием достоверных отличий как у пестряток, так и смолтов. При этом в печени у рыб из группы “24LD+КД” показаны достоверные изменения, не характерные для смолтификации: снижение содержания ( $n-3$ ) ПНЖК, увеличение ( $n-6$ ) ПНЖК и МНЖК. Отметим, что в нашей работе, описывающей изменения липидных классов у пестряток и смолтов (неопубликованные данные), в данной экспериментальной группе продемонстрировано существенное отличие от рыб двух других групп, что подтверждает долговременную перестройку липогенеза в печени вплоть до образования смолтов (март) на введенное круглосуточное освещение еще на стадии сеголетка.

Таким образом, использование круглосуточного освещения и режима кормления в технологическом цикле выращивания молоди лосося в условиях аквакультуры дает возможность получить жизнеспособных смолтов уже на первом году жизни, что подтверждается количественной оценкой липидного и жирнокислотного состава. Жирнокислотный спектр смолтов из эксперимента характеризуется изменением ключевых ЖК-факторов, свидетельствующих о полноценном завершении смолтификации и их готовности к новым условиям обитания: значительным увеличением содержания ПНЖК за счет ( $n-3$ ) ПНЖК, а в них ЖК “морского” типа – 22:6( $n-3$ ), высокими значениями соотношений ( $n-3$ )/( $n-6$ )ПНЖК, 18:3( $n-3$ )/18:2( $n-6$ ), 22:6( $n-3$ )/18:3( $n-3$ ). Наиболее показательные изменения отмечены в мышечной ткани, и для всех экспериментальных групп показано, что снижение НЖК и повышение общей ненасыщенности липидов происходит в первую очередь именно за счет ПНЖК, в то время как МНЖК снижается наряду с НЖК.

В целом данные экспериментальных исследований липидного и жирнокислотного состава молоди лосося, а также сведения с рыбоводного предприятия о доле смолтов в исследуемых группах свидетельствуют о том, что наиболее успешно процесс смолтификационной перестройки происходил в группах “24LD+КК” и “ЕстLD+КД”. Понимание механизмов, связанных с изменением жирнокислотного профиля в процессе смолтификации, позволяет оптимизировать условия выращивания лосося в аквакультуре.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П “Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлан-

тического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика”.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stefansson S.O., Bjornsson B.Th., Ebbesson L.O.E., McCormick S.D. Smoltification // Fish Larval Physiology / Eds Finn R.N., Kapoor B.G. Enfield: Science Publishers, 2008. P. 639–681.
2. Bjornsson B.T., Stefansson S.O., McCormick S.D. Environmental endocrinology of salmon smoltification // Gen. Comp. Endocrinol. 2011. V. 170. P. 290–298.
3. Duston J., Saunders R.L. Advancing smolting to autumn in age 0+ Atlantic salmon by photoperiod, and long-term performance in sea water // Aquaculture. 1995. V. 135. № 4. P. 295–309.
4. Thrush M.N., Duncan N.L., Bromage N.R. The use of photoperiod in the production of out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts // Aquaculture. 1999. V. 121. № 1–3. P. 29–44.
5. Шульгина Н.С., Чурова М.В., Немова Н.Н. Влияние фотопериода на рост и развитие лососевых *Salmonidae* северных широт // Журн. Общ. Биол. 2021. Т. 82. № 1. С. 68–80.
6. Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Кузнецова М.В., Курицын А.Е., Немова Н.Н. Показатели липидного обмена у сеголеток атлантического лосося *Salmo salar*, в условиях аквакультуры в южном регионе РФ при разных режимах освещения и кормления // Известия РАН. Серия биологическая. 2023а. № 2. С. 134–148.
7. Мурзина С.А., Провоторов Д.С., Воронин В.П., Манойлова Д.И., Курицын А.Е., Пеккоева С.Н., Немова Н.Н. Фосфолипидный состав сеголеток атлантического лосося *Salmo salar* в процессе роста и развития в аквакультуре: влияние разных режимов освещения и кормления // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. 2023б. Т. 509. С. 181–185.
8. Nefedova Z.A. et al. Comparative Characteristics of the Fatty-Acid Composition of Lipids in Factory and Wild Juveniles of Atlantic Salmon *Salmo salar* L. // Contemporary problems of ecology. 2020. V. 13. С. 156–161.
9. Takeuchi T., Watanabe T. Requirement of carp for essential fatty acids // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1977. V. 43. P. 541–551.
10. Coutteau P., Geurden I., Camara M.R., Bergot P., Sorgeloos P. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture // Aquaculture. 1997. V. 155. P. 149–164.

11. Tachtsis B., Camera D., Lacham-Kaplan O. Potential roles of n-3 PUFAs during skeletal muscle growth and regeneration // *Nutrients*. 2018. V. 10. № 3. С. 309.
12. Ackman R.G., Takeuchi T. Comparison of fatty acids and lipids of smolting hatchery-fed and wild Atlantic salmon *Salmo salar* // *Lipids*. 1986. V. 21. №. 2. С. 117–120.
13. Tocher D.R., Fonseca-Madrigal J., Bell J.G., Dick J.R., Henderson R.J., Sargent J.R. Effect of diets containing linseed oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Fish Physiol. Biochem.* 2002. V. 26. P. 157–170.

## COMPOSITION OF FATTY ACIDS OF THE TOTAL LIPIDS IN PARR AND SMOLTS OF ATLANTIC SALMON *SALMO SALAR* L. REARED UNDER DIFFERENT LIGHTING MODES IN AQUACULTURE

**D. S. Provotorov<sup>a,#</sup>, S. A. Murzina<sup>a,##</sup>, V. P. Voronin<sup>a</sup>,  
A. E. Kuritcyn<sup>a</sup>, and Academician of the RAS N. N. Nemova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Petrozavodsk, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: klaydim1@mail.ru*

<sup>##</sup>*e-mail: murzina.svetlana@gmail.com*

In the framework of this study, an experiment was carried out on the introduction of constant artificial lighting (24LD) into the standard technology for growing salmon juveniles under conditions of the southern region (Republic of North Ossetia-Alania) and its effect on the composition of fatty acids (FA) of total lipids in muscles and liver parr and smolts of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. It has been established that the FA spectrum of fish is characterized by a change in the key FA factors, indicating the full completion of smoltification and the readiness of smolts for new habitat conditions: a significant increase in the content of polyene FAs (PUFAs) due to (n-3)PUFA, and in them FA of the “marine” type – 22:6(n-3), high values of the ratios (n-3)/(n-6)PUFA, 22:6(n-3)/18:3(n-3). The most significant changes were noticed in the muscles, and for all experimental groups it was found that a decrease in saturated fatty acids (SFA) and an increase in total lipid unsaturation occurs primarily due to PUFAs, while monoene FAs decrease along with SFAs. The data of experimental studies of the lipid and fatty acid composition of salmon youngs, as well as a higher proportion of smolts in the studied groups of fish, indicate that the most successful process of smoltification restructuring occurred in groups with constant lighting and 24 hours feeding and a natural regime of lighting and feeding.

*Keywords:* fatty acids, ontogeny, adaptation, light, feeding, aquaculture

УДК 618.3-06

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЛАЦЕНТЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ И GESTАЦИОННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

© 2023 г. К. А. Артемьева<sup>1,\*</sup>, Ю. В. Степанова<sup>2</sup>, И. И. Степанова<sup>1</sup>, М. В. Шамаракова<sup>3</sup>,  
Н. Б. Тихонова<sup>1</sup>, Н. В. Низяева<sup>1</sup>, С. Г. Цахилова<sup>2</sup>, член-корреспондент РАН Л. М. Михалева<sup>1</sup>

Поступило 11.07.2023 г.  
После доработки 05.09.2023 г.  
Принято к публикации 08.09.2023 г.

Гестационный сахарный диабет (ГСД) и преэклампсия (ПЭ) являются частыми осложнениями беременности со сходными факторами риска. Хотя ГСД связан с ПЭ, точный механизм, лежащий в основе ассоциации этих заболеваний, неясен.

Цель работы: исследовать морфофункциональные и молекулярные изменения в плаценте и периферической крови при ПЭ и ГСД. В исследовании мы оценили местные и системные изменения продукции ряда плацентарных белков, маркеров воспаления и метаболических нарушений. Отметим изменение экспрессии ворсинами плацентарного лактогена, трофобластического  $\beta$ 1-гликопротеина, плацентарного альфа-1-микроглобулина и протеиназы 3 в группах осложненных беременностей. В настоящем исследовании показано сходство патогенетических механизмов, лежащих в основе ПЭ и ГСД.

**Ключевые слова:** беременность, преэклампсия, гестационный сахарный диабет, плацентарные белки, воспаление

**DOI:** 10.31857/S2686738923600553, **EDN:** GPFMGI

### ВВЕДЕНИЕ

Гестационный сахарный диабет (ГСД) и преэклампсия (ПЭ) являются частыми осложнениями беременности со сходными факторами риска (ожирение, возраст более 35 лет, многоплодная беременность и др.) [1]. ГСД считают нарушением толерантности к глюкозе, впервые выявленное во время беременности. Он ассоциируется с акушерскими и неонатальными осложнениями и признается фактором риска развития кардиоме-

таболических заболеваний у матери и потомства в будущем. Исследования показали также, что заболеваемость ПЭ значительно увеличивается при ГСД [2].

ПЭ характеризуется появлением *de novo* гипертонии (систолическое или диастолическое артериальное давление  $\geq 140$  или  $\geq 90$  мм рт.ст. соответственно), диагностированной после 20 нед беременности с протеинурией, и/или с дисфункцией, по крайней мере, одного органа (почки, печень, нервная система и т.д.) и является основной причиной материнской и фетальной заболеваемости и смертности [3]. ГСД, осложненный ПЭ, еще больше увеличивает перинатальные нежелательные явления, будущий риск развития у матери артериальной гипертонии, сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета [3–5].

Как при ГСД, так и при ПЭ патофизиологические процессы включают окислительный стресс, усиление воспалительного ответа и эндотелиальную дисфункцию, что приводит к неадекватной перфузии и гипоксии плаценты [6]

Хотя ГСД связан с ПЭ, точный механизм, лежащий в основе ассоциации этих заболеваний, неясен. Патофизиологический процесс ПЭ включает в себя раннюю недостаточную инвазию трофобла-

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского”, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО “Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова” Минздрава РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup>Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы “Городская клиническая больница имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения города Москвы” ГБУЗ “ГКБ им. С.С. Юдина ДЗМ”, Москва, Россия

\*e-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru



ста, приводящую к неполному ремоделированию спиральных артерий, что вызывает плацентарную ишемию и окислительный стресс. Гипергликемия может вызывать воспаление и аутофагию клеток трофобласта, ингибировать его миграцию и инвазию.

Нейтрофилы при ГСД и ПЭ чрезмерно активируются и высвобождают избыточное количество нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), включающих нити ДНК и сериновые протеазы (катепсин G, нейтрофильная эластаза (НЭ) и протеиназа 3 (Пр 3)) в местах воспаления. Недавние исследования показали, что эти протеазы способны активировать провоспалительные цитокины, включая интерлейкин (ИЛ)-1 бета и TNF-альфа. Чрезмерное образование NET препятствует кровообращению в ворсинчатом пространстве, что приводит к плацентарной ишемии [1, 7].

Местные плацентарные регуляторные факторы особенно важны для диалога между фетальным и материнским компартментом непосредственно на фетоплацентарной границе, а также для контроля роста, дифференцировки и функций самой плаценты. Кроме того, плацентарные гормоны могут также влиять на отдаленные мишени в материнском организме, выполняя такие функции, как адаптация материнского кровообращения к беременности, обеспечение гемотрофии плода или развитие и функция молочной железы [8]. Плацентарный лактоген (ПЛ) представляет собой пептидный гормон, секретируемый на протяжении всей беременности. Он играет важную роль в регуляции секреции инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы. Нарушение регуляции секреции ПЛ может способствовать плацентарной дисфункции и диабетической ретинопатии, а также задержке роста плода или макросомии и повлиять на метаболический статус во взрослом возрасте [8].

Трофобластический  $\beta$ 1-гликопротеин (ТБГ) является одним из наиболее информативных маркеров формирования и функционирования фетоплацентарной системы. Продемонстрировано, что ТБГ вносит свой вклад в формирование иммунной толерантности в период беременности, повышая уровень Treg, и стимулируя продукцию ИЛ-10 этой субпопуляцией Т-лимфоцитов, одновременно угнетая продукцию ИЛ-17А субпопуляцией Th17 [9].

Плацентарный альфа-1-микроглобулин (ПАМГ, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста -1, IGFBP 1) влияет на метаболизм и рост клеток. ПАМГ играет важную локальную роль во время беременности вследствие участия в имплантации и росте плода. Повышенные концентрации ПАМГ были обнаружены при ПЭ, причем как децидуа, так и печень, вероятно, участвовали в его продукции [10].

Адипокины (гормоны жировой ткани) отвечают за регуляцию некоторых физиологических функций. Один из важных адипокинов является адипонектин. Секреция адипонектина стимулируется инсулином. Адипонектин участвует в регуляции уровня глюкозы и расщепления жирных кислот. Полагают, что адипонектин выполняет защитную функцию против гипергликемии, инсулинорезистентности и атеросклероза.

Адипонектин оказывает непосредственное влияние на функцию плаценты, модулируя транспорт питательных веществ плоду сложным взаимодействием между передачей сигналов инсулина, реакцией на них и профилем цитокинов. [11]. Отсутствие совершенных маркеров для прогнозирования возникновения ПЭ у женщин с ГСД диктует необходимость углубленно изучать патофизиологию ГСД и ПЭ. В настоящее время ни одно исследование достоверно не выявляет плацентарную дисфункцию на поздних сроках беременности.

Цель работы: исследовать морфофункциональные и молекулярные изменения в плаценте и периферической крови при ПЭ и ГСД.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие беременные, страдающие ГСД ( $n = 35$ ), ПЭ ( $n = 35$ ), ПЭ в сочетании с ГСД ( $n = 30$ ) и женщины с неосложненной физиологической беременностью (ФБ) ( $n = 30$ ) соответствующих сроков гестации.

Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

### *Критерии включения в группу ПЭ:*

1. Одноплодная беременность;
2. Возраст беременной от 18 до 40 лет;
3. Наличие критериев ПЭ (артериальная гипертензия (артериальное давление  $\geq 140/90$  мм рт. ст.), протеинурия ( $\geq 0.3$  г/л в суточной моче), отеки, проявления полиорганной недостаточности);
4. Родоразрешение путем операции кесарева сечения.

### *Критерии включения в группу ФБ:*

1. Физиологическая беременность, наступившая в естественном цикле;
2. Оперативное родоразрешение по акушерским показаниям;
3. Содержание белка в моче  $< 100$  мкг/мл;
4. Отсутствие признаков артериальной гипертензии;
5. Концентрация глюкозы венозной плазмы  $< 5.1$  ммоль/л натощак

*Критериями включения в группу ГСД послужили:* выявление глюкозы венозной плазмы натощак  $\geq 5.1$ , но  $< 7.0$  ммоль/л на любом сроке беременно-

**Таблица 1.** Уровень плацентарных белков, протеиназы 3 и адипонектина в плазме крови

	ПАМГ нг/мл	ТБГ мкг/мл	ПЛ, мг/л	Протеиназа 3 нг/мл	Адипонектин мкг/мл
Физиологическая беременность I	29.35 (24.65;34.4)	246.3 (136.93;630.68)	0.9 (0.15;1.3)	21.45 (15.08;51)	10.99 (6.52;16.03)
ГСД 2	40.4 (19.5;52.8)	252.4 (85.3; 415.4)	1.09 (0.93;2.4)	10.6 (5.57;21.8)	5.7 (5.23;7.39)
ПЭ 3	58.9* (53.7;127.7)	266.5 (226.45; 431.3)	1.6 (0.8;2)	12.9 (6.1;36.8)	6.11 (4.75;7.42)
ГСД+ПЭ 4	53.6 (36.6;84.08)	216.1 (171.05;317.25)	1.79 (0.8;2.28)	7.85 (4.43;18.8)	6.24 (4.02;7.15)
Значимость различий	p1–2 = 0.469	p1–2 = 0.419	p1–2 = 0.056	p1–2 = 0.011	p1–2 = 0.019
	p1–3 < 0.001	p1–3 = 0.982	p1–3 = 0.046	p1–3 = 0.02	p1–3 = 0.027
	p1–4 = 0.002	p1–4 = 0.693	p1–4 = 0.026	p1–4 = 0.015	p1–4 = 0.007
	p2–4 = 0.032	p2–4 = 0.842	p2–4 = 0.602	p2–4 = 0.602	p2–4 = 0.552
	p3–4 = 0.177	p3–4 = 0.190	p3–4 = 0.819	p3–4 = 0.360	p3–4 = 0.643

**Таблица 2.** Интенсивность ИГХ-окрашивания плаценты, ЕОП

	ПАМГ	ТБГ	ПЛ	Протеиназа 3
Физиологическая беременность I	60.46 (53.95;63.8)	56.82 (31.49;85.00)	35.05 (31.89;40.32)	31.88 (28.66;38.02)
ГСД 2	46.84 (38.17;63.07)	47.99 (42.96;70.79)	82.46 (60.50;93.76)	60.94 (50.75;73.80)
ПЭ 3	75.49 (66.28;85.61)	71.76 (62.39;78.89)	70.10 (64.63;76.22)	61.67 (58.0;70.43)
ГСД+ПЭ 4	40.88 (32.52;58.06)	84.11 (80.91;93.04)	70.20 (65.53;77.31)	64.42 (49.95; 73.11)
Значимость различий	p1–2 = 0.014	p1–2 = 0.894	p1–2 < 0.001	p1–2 < 0.001
	p1–3 < 0.001	p1–3 = 0.374	p1–3 < 0.001	p1–3 < 0.001
	p1–4 = 0.017	p1–4 = 0.017	p1–4 < 0.001	p1–4 = 0.009
	p2–4 = 0.519	p2–4 < 0.001	p2–4 = 0.081	p2–4 = 0.894
	p3–4 = 0.009	p3–4 = 0.004	p3–4 = 0.963	p3–4 = 0.736

сти, в т. ч. после проведенного перорального глюкозотолерантного теста через 1 ч  $\geq 10.0$  ммоль/л, через 2 ч  $\geq 8.5$ , но  $< 11.1$  ммоль/л. [12].

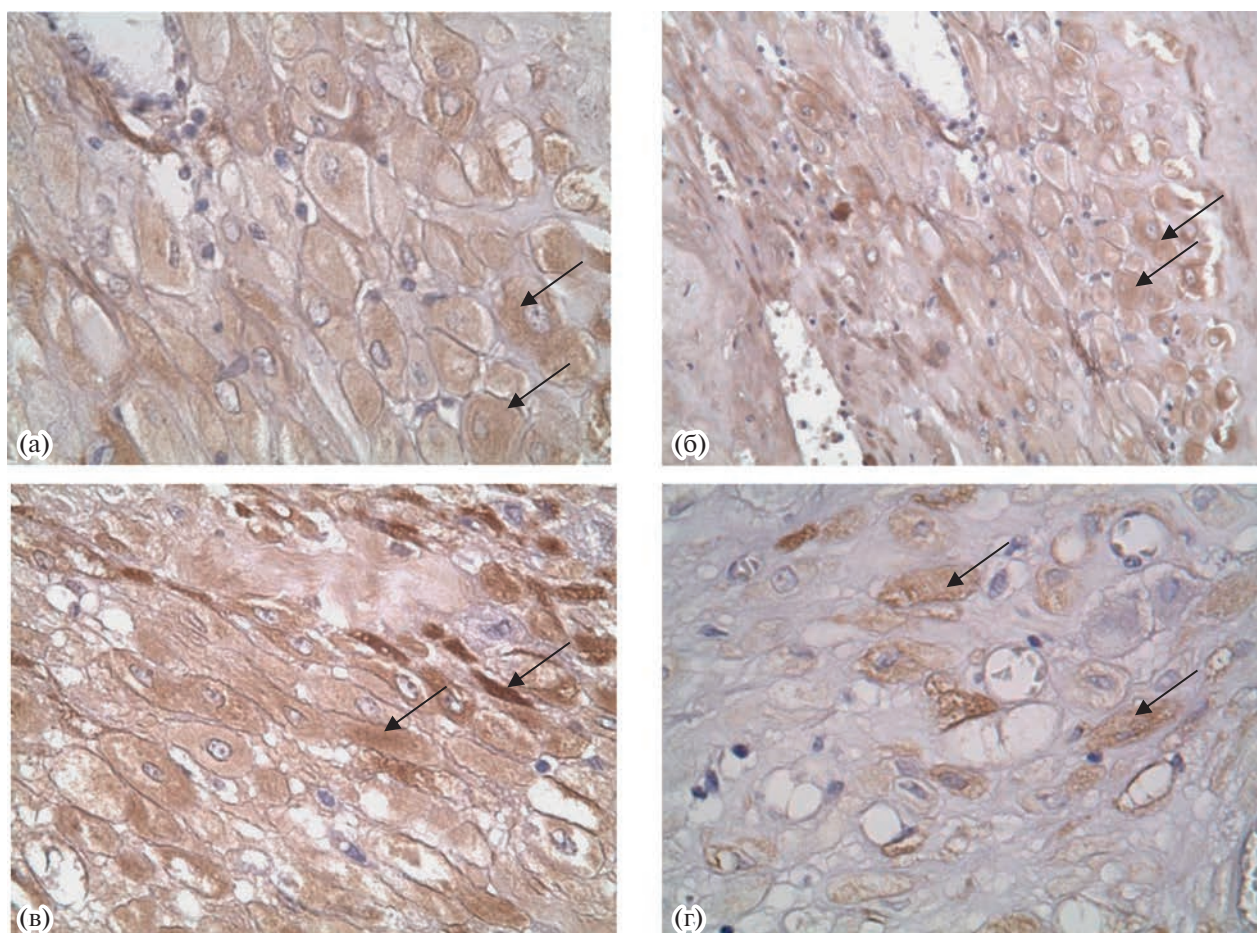
В группу ПЭ+ГСД вошли беременные, сочетающие признаки групп ПЭ и ГСД.

#### Гистологическое исследование

Фрагменты ткани плаценты пациенток были взяты из краевой, парацентральной и центральной зон плацентарного диска. Полученные кусочки размерами  $1.5 \times 1.5 \times 1$  см фиксировали в

10%-ном растворе формалина, pH = 7.4 (Biovit-gum, Россия) в течение 24 ч, затем заливали в парафин. Далее из них изготавливали срезы толщиной 4 мкм. Исследовали не менее 10 фрагментов.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование выполняли на парафиновых срезах плаценты. В качестве первичных антител (АТ) были использованы мышинные моноклональные АТ к ПАМГ, ТБГ, ПЛ, Пр 3, полученные в лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. Б.В. Петровского, как описано Н.А. Старосветской и соавт. [13]. Приме-



**Рис. 1.** Иммуногистохимическое окрашивание плаценты антителами к ПАМГ (положительное окрашивание децидуальных клеток отмечено стрелками). Ув. 400. (а) физиологическая беременность, (б) беременность, осложненная ГСД, (в) беременность, осложненная ПЭ, (г) беременность, осложненная ПЭ и ГСД.

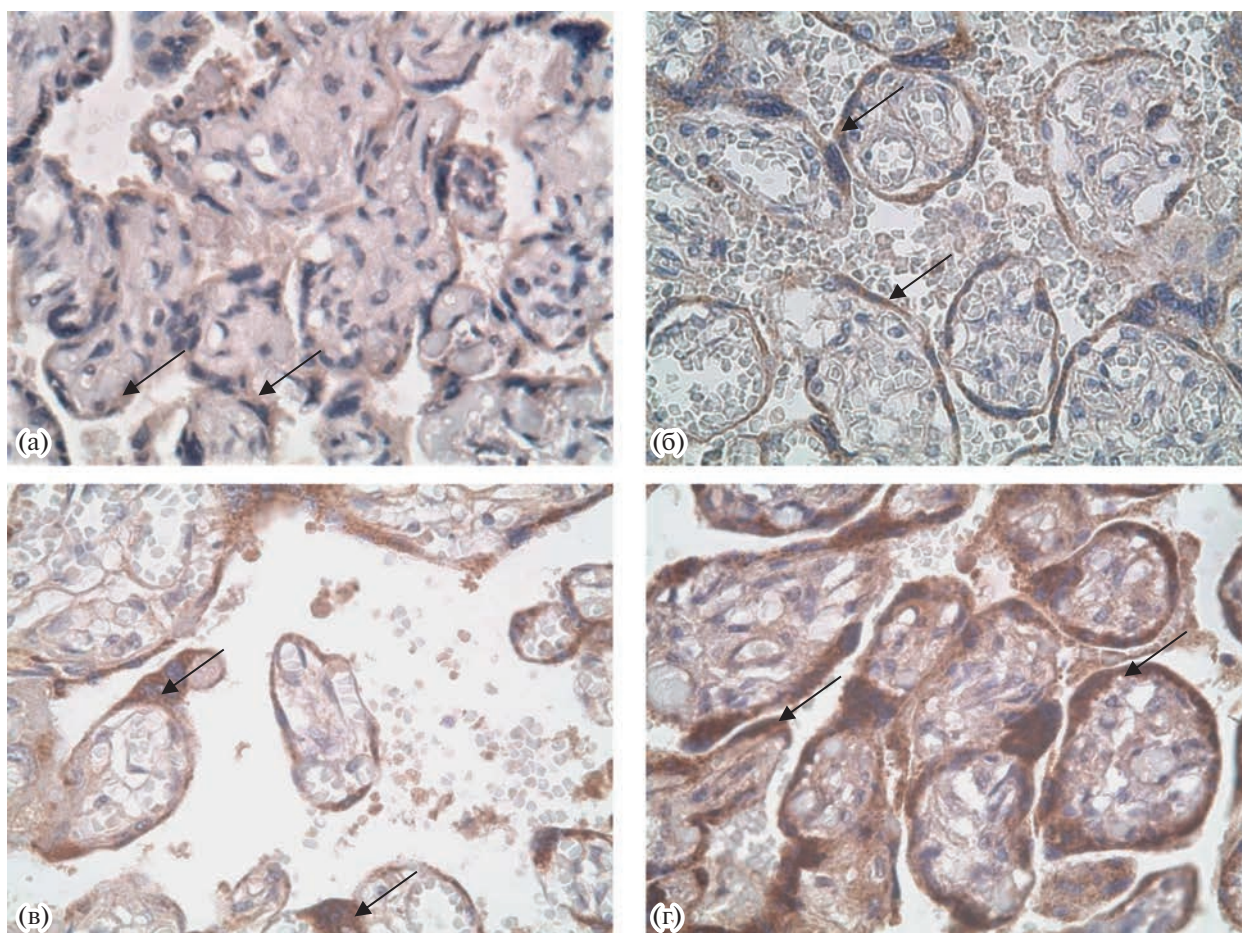
няли универсальную двухкомпонентную систему детекции PrimeVision (ООО “ПраймБиоМед”, Россия). По окончании инкубации срезы докрасивали гематоксилином Майера. Для отрицательного контроля протокол ИГХ-исследования проводили без использования первичных АТ. Интенсивность ИГХ окрашивания оценивали в единицах оптической плотности (ЕОП) с применением светового микроскопа Leica DM 2500 с цифровой фотокамерой при помощи графического планшета и программы ImageScoreM (Leica Microsystems GmbH, Германия) при увеличении  $\times 400$  с анализом 20 полей зрения в каждом препарате, вычитая оптическую плотность фона пустого стекла и отрицательного контроля.

#### *Иммуноферментный анализ (ИФА)*

ИФА для ПЛ, ТБГ человека и ПАМГ, человека проводили в соответствии с инструкциями производителя (ООО “Диатех-ЭМ”). Концентрацию

адипонектина и Пр 3 выявляли методом количественного ИФА по принципу “сэндвич” на 96-луночных полистирольных пластинах (Maxibinding, SPL Life Sciences Co. Ltd., Сеул, Корея) на основе мышинных моноклональных антител (МАТ) (клон PN17/PN17 (адипонектин) и клоны PR49/PR45 (Пр 3), полученных в лаборатории патологии репродукции ФГБНУ НИИМЧ РНЦХ, Москва, Россия).

*Статистическую обработку* полученных результатов проводили с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc.). Нормальность распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Для оценки различий в группах применялся метод парных сравнений Манна—Уитни. Результаты представляли в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ , при  $p < 0.1$  отмечали тенденцию к развитию изменений.



**Рис. 2.** Иммуногистохимическое окрашивание плаценты антителами к ТБГ (положительное окрашивание синцитиотрофобласта ворсин плаценты отмечено стрелками). Ув. 400. (а) физиологическая беременность, (б) беременность, осложненная ГСД, (в) беременность, осложненная ПЭ, (г) беременность, осложненная ПЭ и ГСД.

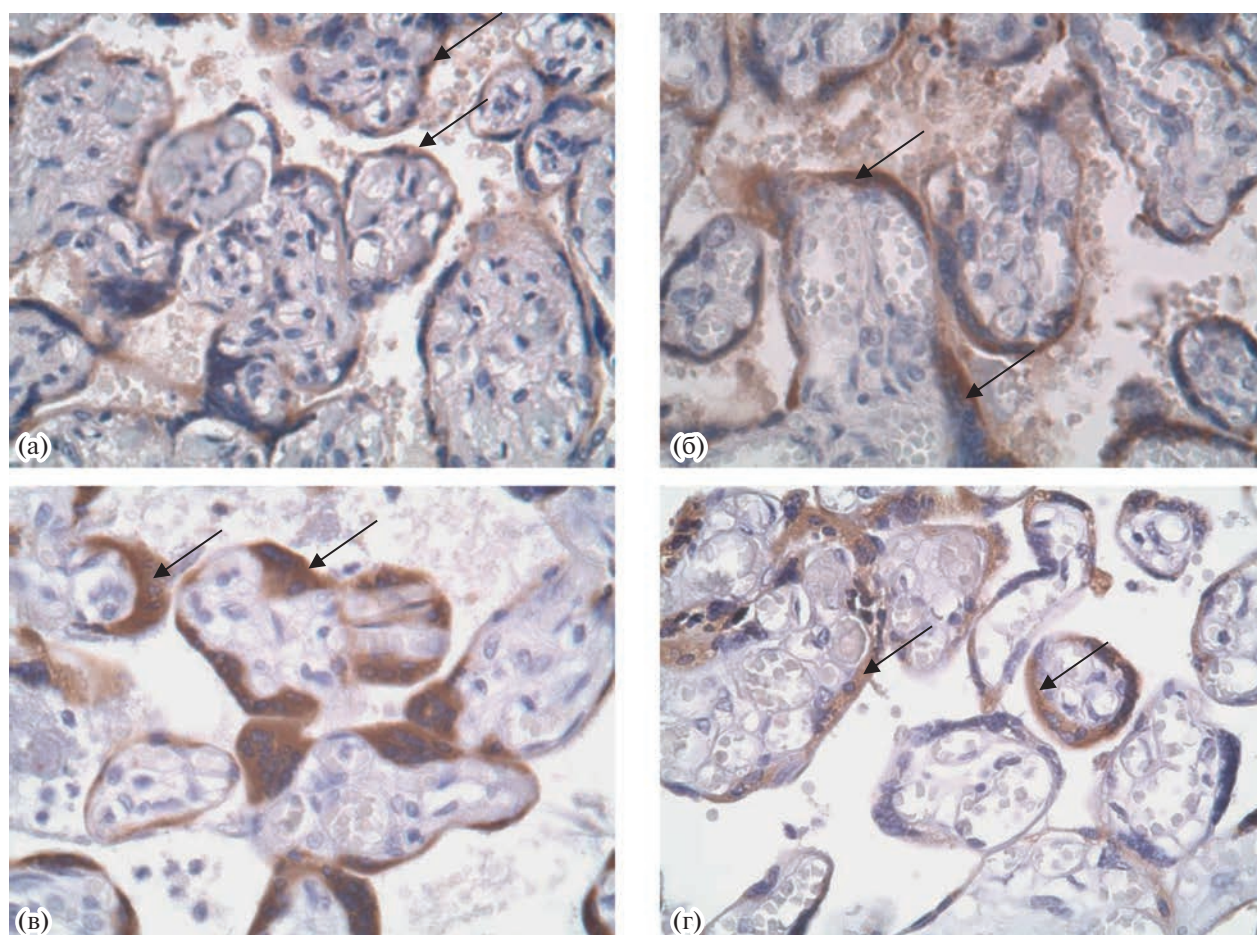
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ИФА (табл. 1) показали увеличение концентрации ПАМГ и ПЛ в плазме крови женщин всех исследуемых групп в сравнении с группой ФБ. Показатели ТБГ значимо не различались во всех группах. Уровень адипонектина был наименьшим в группе ФБ и не различался между группами исследования. Содержание Пр3 в группе ФБ было наибольшим в противовес локальному обнаружению Пр3 в ворсинах.

В результате ИГХ-исследования (табл. 2, рис. 1–4) выявили усиление окрашивания ворсин АТ к ПЛ в группах беременностей, осложненных как отдельно ГД и ПЭ, так и их сочетанием. Отмечалось снижение окрашивания ворсин АТ к ПАМГ в группах с ГСД и ПЭ+ГСД относительно группы с ФБ (рис. 1). Наиболее интенсивное окрашивание АТ к ТБГ было отмечено в группах ПЭ и ПЭ+ГСД (рис. 2). Отмечали неравномерность окрашивания ворсин АТ к ПЛ, а также слущивание клеток трофобласта в межворсинчатое пространство (рис. 3). АТ к Пр3 интенсивно

окрасили ворсины плацент всех исследуемых групп в сравнении с ФБ (рис. 4).

Следует отметить, что трудности, связанные с диагностикой ПЭ у женщин с протеинурией, присутствующей до беременности, являются серьезными препятствиями для исследований в группе ПЭ и сахарного диабета (СД) [2]. Результаты исследований оценки экспрессии ПАМГ в децидуальных клетках при ПЭ противоречивы. Экспрессия ПАМГ была повышена в плаценте при ПЭ, а сверхэкспрессия ингибировала пролиферацию, инвазию, миграцию культуры клеток НТR-8/SVneo [14]. В то же время выявлено, что ПАМГ децидуальной пластинки стимулирует миграцию клеток вневорсинчатого трофобласта (ВВТ) путем связывания с интегрином  $\alpha 5\beta 1$ , независимо от IGF в системе мать–плод [8]. Материнская гиперинсулинемия может вызвать подавление секреции ПАМГ из децидуальных клеток, что приводит к снижению миграции ВВТ и плацентарной дисфункции. В нашем исследовании локальная экспрессия ПАМГ у женщин с



**Рис. 3.** Иммуногистохимическое окрашивание плаценты антителами к плацентарному лактогену (положительное окрашивание синцитиотрофобласта ворсин плаценты отмечено стрелками). Ув. 400. (а) физиологическая беременность, (б) беременность, осложненная ГСД, (в) беременность, осложненная ПЭ, (г) беременность, осложненная ПЭ и ГСД.

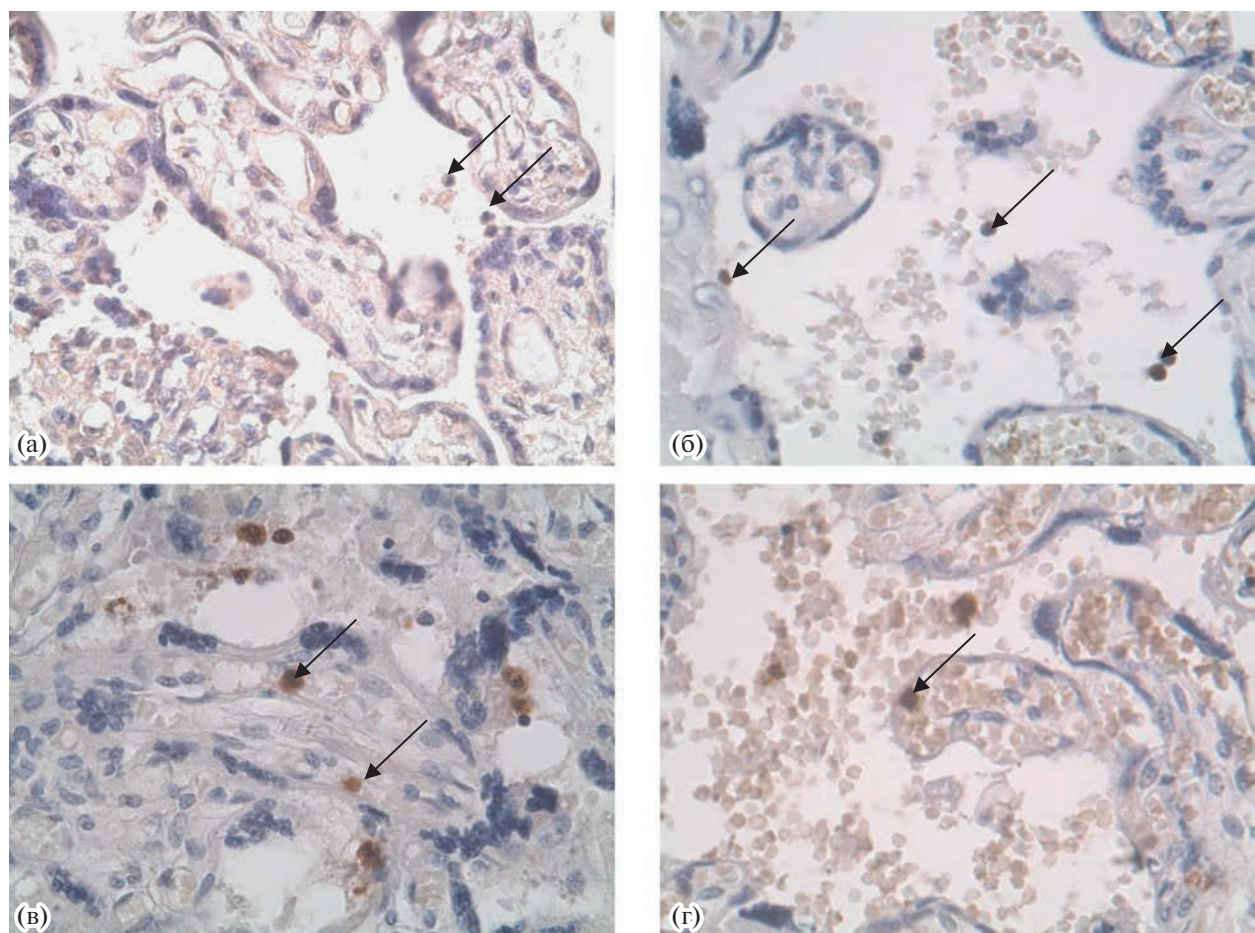
ГСД и ПЭ+ГСД в плаценте была снижена, но концентрация его увеличена в плазме крови у женщин всех групп с осложненной беременностью, что является подтверждением гипотезы о роли ПАМГ в стимуляции миграции ВВТ, а снижение экспрессии ПАМГ наблюдается при аномальной инвазии трофобласта при ПЭ [14].

ТБГ модулирует адгезию и миграцию ВВТ путем связывания с интегрином  $\alpha 5\beta 1$  [9]. Наиболее интенсивное окрашивание АТ к ТБГ было обнаружено в группах ПЭ и ПЭ+ГСД. Очевидно, его локальное повышение в плаценте является компенсаторным при развитии ПЭ. Кроме того, ТБГ посредством активации TGF- $\beta 1$  способствует установлению иммунологической толерантности.

ПЛ играет доминирующую роль в стимулировании пролиферации  $\beta$ -клеток и выработке инсулина во время беременности и может регулироваться адипонектином [15]. Следует учитывать, что при протеолитическом расщеплении ПЛ об-

разуется вазоингибин. Плацентарный вазоингибин может выполнять функции контроля роста кровеносных сосудов в плаценте, но также способствовать и ее патологии при ПЭ [16]. Наши результаты показали увеличение концентрации ПЛ в плазме крови и усиление окрашивания ворсин плаценты у женщин всех исследуемых групп осложненной беременности в сравнении с группой ФБ, что подтверждает его важную патогенетическую роль в развитии как ПЭ, так и ГСД.

Адипонектин регулирует пролиферацию, дифференцировку и инвазию трофобласта, а также ангиогенез в децидуальной оболочке, посредством секреции ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, TNF- $\alpha$  и PGE2 [17, 18]. Уровень адипонектина в сыворотке крови матери снижается от первого триместра к третьему во время неосложненной беременности. Отмечено, что адипонектин защищает организм от гипертонии, подавляя действие ангиотензина II в РААС, эндотелиальной дисфункции, воспаления и протеинурии [18]. Кроме того, снижение экс-



**Рис. 4.** Иммуногистохимическое окрашивание плаценты антителами к протеиназе 3 (положительное окрашивание нейтрофилов в ворсинах плаценты отмечено стрелками). Ув. 400. (а) физиологическая беременность, (б) – беременность, осложненная ГСД, (с) беременность, осложненная ПЭ, (д) беременность, осложненная ПЭ и ГСД.

прессии адипонектина коррелирует с инсулино-резистентностью, а также ассоциировано с ожирением [1]. В нашем исследовании все группы осложненной беременности характеризовались уровнем сывороточного адипонектина повышенным относительно группы ФБ. Следовательно, дисрегуляция плацентарной экспрессии и циркулирующего уровня адипонектина может вызвать аномальную плацентацию и ПЭ.

Известно, что при воспалении, вызванном сепсисом, нейтрофилы способствуют сосудистой дисфункции. Пр3 и НЭ, в избытке содержащиеся в них, высвобождаются при дегрануляции [18]. Роль Пр3 в эндотелиальной дисфункции в значительной степени не ясна. Вероятно, Пр3, подобно НЭ, ведет к дисфункции сосудистого барьера и повышенной эндотелиальной проницаемости [2, 7, 19]. При развитии ПЭ и ГСД Пр3, вероятно, служит подобным патогенетическим механизмом, что проявляется в локальном (плацентарном) ее повышении и системном снижении при осложненной беременности. В этой работе мы не

исследовали корреляцию между интенсивностью ИГХ-окрашивания и уровнем белков в ИФА, т.к. она не всегда бывает абсолютной, в связи с локальной де- или компенсаторной выработкой тех или иных веществ плацентой. Следует учесть и тот факт, что ряд белков имеет не только плацентарное, но и экстраплацентарное происхождение и может синтезироваться в небольших дозах в печени, легких, а также в клетках децидуальной трансформации [20].

Интересно отметить, что ожирение меньше влияет на течение ПЭ у женщин с ГСД по сравнению с женщинами без ГСД [1, 7]. Показано, что ПЭ в сочетании с ГСД течет более благоприятно по сравнению с изолированной ПЭ как клинически, так и с учетом лабораторных критериев. Можно предположить, что начальные стадии нарушения углеводного обмена “сдерживают” патологический каскад ПЭ, стимулируя ангиогенез [21]. В нашем исследовании группа ПЭ в сочетании с ГСД также не показала значимого утяжеления состояния пациенток, что подтверждает эту гипотезу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования нами было отмечено сходство патогенетических механизмов ПЭ и ГСД. В настоящей работе мы оценили местные и системные изменения продукции ряда плацентарных белков, маркеров воспаления и метаболических нарушений. Отметим усиление окрашивания ворсин антителами к плацентарному лактогену и протеиназе 3 во всех группах, снижение окрашивания ворсин антителами к плацентарному альфа-1-микроглобулину в группах, осложненных ГСД, а также интенсивное окрашивание антителами к трофобластическому  $\beta$ 1-гликопротеину в группах пациенток, осложненных ПЭ. Выявили увеличение концентрации плацентарного альфа-1-микроглобулина, плацентарного лактогена и адипонектина в плазме крови всех групп. Дальнейшее изучение и выявление факторов, связанных с ПЭ у женщин с ГСД, важно для улучшения исходов беременности, оптимизация лечения и ведения ГСД может снизить тяжесть течения и частоту ПЭ, что важно для улучшения исходов беременности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yang Y., Wu N.* Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia: Correlation and Influencing Factors // *Front Cardiovasc Med.* 2022. V. 9. P. 831297.
2. *Weissgerber T.L., Mudd L.M.* Preeclampsia and diabetes // *Curr Diab Rep.* 2015. V. 15. № 3. P. 9.
3. *Brown M.A., Magee L.A., Kenny L.C., et al.* Hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis, and management recommendations for international practice // *Hypertension.* 2018. V. 72. P. 24–43.
4. *Kul S., Guvenc T.S., Baycan O.F., et al.* Combined past preeclampsia and gestational diabetes is associated with a very high frequency of coronary microvascular dysfunction // *Microvasc Res.* 2021. V. 134. P. 104104.
5. *Vounzoulaki E., Khuntia K., Abner S.C., et al.* Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis // *BMJ.* 2020. V. 369. P. m1361.
6. *Phoswa W.N., Khaliq O.P.* The role of oxidative stress in hypertensive disorders of pregnancy (preeclampsia, gestational hypertension) and metabolic disorder of pregnancy (gestational diabetes mellitus) // *Oxid Med Cell Longev.* 2021. V. 2021. P. 5581570.
7. *Rattila S., Kleefeldt F., Ballesteros A., et al.* Pro-angiogenic effects of pregnancy-specific glycoproteins in endothelial and extravillous trophoblast cells // *Reproduction.* 2020. V. 160. № 5. P. 737–750.
8. *Sibiak R., Jankowski M., Gutaj P., et al.* Placental Lactogen as a Marker of Maternal Obesity, Diabetes, and Fetal Growth Abnormalities: Current Knowledge and Clinical Perspectives // *J Clin Med.* 2020. V. 9. № 4. P. 1142.
9. *Заморина С.А., Раев М.Б.* Иммунорегуляторный потенциал трофобластического  $\beta$ -гликопротеина: перезагрузка // *Медицинская иммунология.* 2015. Т. 17. № 5. С. 27.
10. *Mokkala K., Juhila J., Houttu N., et al.* Early pregnancy serum IGFBP-1 relates to lipid profile in overweight and obese women // *Heliyon.* 2020. V. 6. № 8. P. 04788.
11. *Abraham T., Romani A.M.P.* The Relationship between Obesity and Pre-Eclampsia: Incidental Risks and Identification of Potential Biomarkers for Pre-Eclampsia // *Cells.* 2022. V. 11. № 9. P. 1548.
12. Клинические рекомендации. Гестационный сахарный диабет. Диагностика, лечение, акушерская тактика, послеродовое наблюдение. М. 2020 г. / *Gestational diabetes mellitus. (Clinical recommendations).* [In Russ.] М. 2020.
13. *Старосветская Н.А., Назимова С.В., Степанова И.И. и др.* Получение комплекса моноклональных антител для иммуногистохимических исследований в области физиологии и патологии репродукции // *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2012. № 2. С. 22–27.
14. *Li X., Li C., Wang Y., et al.* IGFBP1 inhibits the invasion, migration, and apoptosis of HTR-8/SVneo trophoblast cells in preeclampsia // *Hypertens Pregnancy.* 2022. V. 41. № 1. P. 53–63.
15. *Qiao L., Saget S., Lu C., et al.* Adiponectin Promotes Maternal  $\beta$ -Cell Expansion Through Placental Lactogen Expression // *Diabetes.* 2021. V. 70. № 1. P. 132–142.
16. *Markl-Hahn H., Neugebauer L., Lenke L., et al.* Human Placental Tissue Contains A Placental Lactogen-Derived Vasoinhibin // *J Endocr Soc.* 2022. V. 6. № 4. P. bvac029.
17. *Adu-Gyamfi E.A., Fondjo L.A., Owiredo W.K.B.A., et al.* The role of adiponectin in placentation and preeclampsia // *Cell Biochem Funct.* 2020. V. 38. № 1. P. 106–117.
18. *Meyer-Hoffert U.* Neutrophil-derived serine proteases modulate innate immune responses // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2009. V. 14. № 9. P. 3409–3418.
19. *Patterson E.K., Gillio-Meina C., Martin C.M., et al.* Proteinase 3 contributes to endothelial dysfunction in an experimental model of sepsis // *Exp Biol Med (Maywood).* 2021. V. 246. № 21. P. 2338–2345.
20. *Smits L., Bockstal M.V., Frezin J.* Deciduoisis of the appendix: a rare cause of acute abdomen during pregnancy (a case report) // *Pan Afr Med J.* 2020. V. 37. P. 316.
21. *Беттихер О.А., Зазерская И.Е., Попова П.В., и др.* Характеристика преэклампсии у беременных с гестационным диабетом // *Журнал акушерства и женских болезней.* 2019. Т. 68. № 5. С. 19–36.

## MORPHOFUNCTIONAL AND MOLECULAR CHANGES IN PLACENTA AND PERIPHERAL BLOOD IN PREECLAMPSIA AND GESTATIONAL DIABETES MELITUS

**K. A. Artemieva<sup>a,#</sup>, Yu. V. Stepanova<sup>b</sup>, I. I. Stepanova<sup>a</sup>, M. V. Shamarakova<sup>c</sup>, N. B. Tikhonova<sup>a</sup>, N. V. Nizyaeva<sup>a</sup>, S. G. Tsakhilova<sup>b</sup>, and Corresponding Member of the RAS L. M. Mikhaleva<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*“A.P. Avitsyn research institute of human morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery”,  
Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup>*Evdokimov Moscow State University and Dentistry, Moscow, Russian Federation*

<sup>c</sup>*SBHI of Moscow “City Clinical Hospital named after S.S. Yudin” of the Healthcare Department of Moscow,  
Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: artemjeva\_ksenia@mail.ru*

Gestational diabetes mellitus (GDM) and preeclampsia (PE) are common pregnancy complications with similar risk factors. Although GDM is associated with PE, the exact mechanism underlying the association of these diseases is unclear. The aim of the work: to study morphofunctional and molecular changes in the placenta and peripheral blood both in PE and GDM. In the study, we evaluated local and systemic changes in the production of several placental proteins, markers of inflammation and metabolic disorders. Changes in villi expression of placental lactogen, trophoblastic  $\beta$ 1-glycoprotein, placental alpha-1-microglobulin, and proteinase3 were noted in the groups of complicated pregnancies. The present study shows the similarity of the pathogenic mechanisms underlying PE and GDM.

*Keywords:* pregnancy, preeclampsia, gestational diabetes mellitus, placental proteins, inflammation



УДК 599.4:591.52:57.084

## ОСЕННЯЯ МИГРАЦИЯ ГИГАНТСКОЙ ВЕЧЕРНИЦЫ (*NYCTALUS LASIOPTERUS*): ЧЕРЕЗ СТРАНЫ И ГОРЫ К НОВОМУ РЕКОРДУ ДАЛЬНОСТИ СЕЗОННЫХ ПЕРЕЛЕТОВ ЛЕТУЧИХ МЫШЕЙ

© 2023 г. Д. А. Васеньков<sup>1,\*</sup>, Н. С. Васильев<sup>2</sup>, Н. В. Сидорчук<sup>1</sup>, академик РАН В. В. Рожнов<sup>1</sup>

Поступило 06.07.2023 г.

После доработки 30.08.2023 г.

Принято к публикации 02.09.2023 г.

Впервые с помощью GPS-GSM трекеров зарегистрированы длительные сезонные перелеты гигантских вечерниц (*Nyctalus lasiopterus*) из мест летнего обитания в России в места зимовок в Европе. Один из сезонных миграционных перелетов является рекордным по дальности для рукокрылых (2515 км). Максимальный суточный перелет составил 445 км. Один из зверьков на третьи сутки полета после пересечения Курской магнитной аномалии резко сменил направление миграции с юго-западного на северное.

**Ключевые слова:** гигантская вечерница, *Nyctalus lasiopterus*, сезонная миграция, GPS-GSM трекеры

**DOI:** 10.31857/S2686738923700403, **EDN:** GTQDPL

Сезонные миграции – важный этап в жизни многих видов животных. Для некоторых групп, например для птиц, миграции изучаются давно и интенсивно. Благодаря таким исследованиям удалось ответить на многие вопросы, касающиеся их экологии, участия в переносе вещества и энергии в экосистемах разного уровня и взаимодействия с другими организмами. Кроме того, важно изучение участия мигрирующих видов в переносе потенциальных возбудителей заболеваний человека и животных [1].

Среди наземных позвоночных массовые регулярные миграции известны не только для птиц, но и для летающих млекопитающих – рукокрылых. Однако изученность миграций рукокрылых сильно уступает таковой птиц в силу разных причин, включающих, в том числе, методические трудности, обусловленные небольшими размерами этих млекопитающих и их ночным образом жизни. Благодаря многолетним работам по кольцеванию разных видов рукокрылых в России [2], Европе и Северной Америке стали известны примерные районы их зимовок и летнего обитания [3, 4]. Прослеженные ежесуточно маршруты перемещений получены лишь для крупных видов

рукокрылых – крыланов, кочующих вслед за плодоносящими растениями в тропических и субтропических регионах Африки и Австралии [5, 6]. Для “настоящих” мигрирующих видов рукокрылых аналогичных подробных исследований сезонных миграций ранее провести не удавалось. Лишь для одного из самых крупных видов рукокрылых Европы – рыжей вечерницы (*Nyctalus noctula*) – были отслежены начальные этапы миграции [7].

Целью настоящей работы было изучение сезонной миграции крупнейшего насекомоядного вида рукокрылых Европы – гигантской вечерницы (*Nyctalus lasiopterus*) с помощью GPS-GSM трекеров.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения осенней миграции гигантской вечерницы (*Nyctalus lasiopterus*) три особи этого вида были помечены малогабаритными GPS-GSM трекерами на основе чипа MT2503 и алюминиевыми кольцами с индивидуальными номерами. Зверьки были отловлены в районе их летнего обитания в национальном парке “Мещера” в окрестностях д. Тихоново (Гусь-Хрустальный р-н, Владимирская обл.). Данные о помеченных особях, датах их мечения, начала и окончания работы трекеров приведены в табл. 1.

Характеристики GPS-GSM трекеров приведены нами ранее [8]. Для экономии заряда аккумулятора трекеры были запрограммированы на кратковременное включение от встряски во время вылета зверька из убежища, что позволяло ре-

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

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

\*e-mail: [vasenkov.d@yandex.ru](mailto:vasenkov.d@yandex.ru)

**Таблица 1.** Характеристика помеченных гигантских вечерниц и работы трекеров

Трекер и кольцо	Пол и возраст	Дата			Длительность работы трекера, сут
		мечения	начала миграции	окончания работы трекера	
Трекер № 51 (RUSSIA 55-00051)	Самка молодая	12.09.2020	19.09.2020	04.10.2020	22
Трекер № 46 (RUSSIA 55-00046)	Самка взрослая	18.09.2021	28.09.2021	11.10.2021	23
Трекер № 53 (RUSSIA 55-00053)	Самец молодой	18.09.2021	28.09.2021	16.10.2021	28

*Примечание:* возраст молодых особей 3–4 мес, взрослой самки – более одного года.

**Таблица 2.** Параметры миграционных перелетов трех особей гигантской вечерницы

Показатель	Самка № 51	Самка № 46	Самец № 53
Дата начала миграции	19.09.2020	28.09.2021	28.09.2021
Длительность наблюдения за миграцией, сут	15	13	18
Число суточных перелетов во время миграции	12	7	17
Число остановок во время миграции, сут	3	6	1
Доля “активных” суток* во время миграции, %	80	54	94
Дальность миграции (по прямой), км	1439	1678	2515
Длина миграционного трека, км	2135	1754	3360
Максимальный суточный перелет, км	359	415	445
Минимальный суточный перелет, км	14	64	49
Средний суточный перелет, км	142	135	187
Средний суточный перелет (без учета дней остановок), км	178	250	198

*Примечание:* за дни остановок принимали сутки, в течение которых перелеты зверьков не были зафиксированы, либо они были менее 3 км (ранее такая дистанция была неоднократно зарегистрирована нами, когда в течение суток зверьки меняли дневные убежища); \* под “активными” сутками мы понимаем долю (в %) суток с перелетами к общему числу суток (с перелетами и без них).

гистрировать место дневки. После включения трекер передавал через сотовую сеть координаты на сайт [www.livegpsracks.com](http://www.livegpsracks.com), а затем выключался на 11 ч и переходил в режим ожидания полета. В случае неудачной регистрации координат трекером данные о его местоположении определяли по базовым станциям сотовой сети, с которыми он связывался, их номера получали через интернет-сервис [www.livegpsracks.com](http://www.livegpsracks.com). Во время миграции гигантские вечерницы совершали перелеты в ночное время, а на дневку обычно каждые сутки останавливались в новом убежище. Иногда зверьки оставались на дневке более одних суток, что, по-видимому, могло быть связано с погодными условиями. За начало миграции принимали удаление особей более чем на 50 км от района летнего обитания.

Продолжительность работы трекеров была ограничена емкостью аккумуляторов и окончание ее, вероятно, происходило не в конечной точке миграционного перелета. Тем не менее в результате

работы трекеров в течение примерно двух недель была получена ежедневная информация о большей части миграционных маршрутов прослеживаемых особей *N. lasiopterus*.

Обработку пространственных данных проводили в программе QGIS 3.10 ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры миграционных полетов гигантской вечерницы представлены в табл. 2.

В результате работы GPS-GSM трекеров получено три трека продолжительностью от 13 до 18 сут и длиной от 1754 до 3360 км (табл. 2). Расстояния по прямой между местами начала миграции гигантских вечерниц и окончанием передачи данных трекерами составили от 1439 до 2515 км. Самый длинный перелет (как по длине трека, так и по расстоянию по прямой между крайними точками миграции) совершил самец № 53 – в настоящее



Рис. 1. Картограмма осенних миграционных перелетов трех особей гигантской вечерницы, прослеженных с помощью GPS-GSM трекеров. Цифрами обозначены места нахождения каждой особи, соответствующие дням миграции от даты ее начала. Ареал гигантской вечерницы приведен по [9], границы Курской магнитной аномалии (КМА) по [10].

время это рекорд дальности зарегистрированного миграционного перелета для рукокрылых.

Максимальное расстояние, преодоленное зверьками за сутки во время осенней миграции, достигало 445 км (перелет самца между дневками в первые и вторые сутки миграции), минимальное – 14 км (перелет молодой самки № 51, совершенный в конце ее зафиксированного трекером маршрута). Среднее расстояние, преодолеваемое зверьками за сутки – 154.8 км, а без учета остановок – 208.7 км.

Из мест летнего обитания зверьки вылетели во второй половине сентября: в 2020 г. молодая самка № 51 начала осенний миграционный перелет 19 сентября, в 2021 г. два других зверька (молодой самец № 53 и взрослая самка № 46) – 29 сентября. Место вылета всех трех гигантских вечерниц – окрестности д. Тихоново (Владимирская область, Гусь-Хрустальный район), но путь их миграции в юго-западном направлении пролегал по разным маршрутам (рис. 1).

Маршрут взрослой самки № 46, трекер которой закончил свою работу на востоке Болгарии, был самый “рациональный”: он самый короткий,

длина ее трека мало отличается от длины по прямой между начальной и конечной точками маршрута (1754 и 1678 км, соотношение 1.05).

Маршрут молодого самца № 53 проходил западнее, огибал горы в средней части маршрута, что хорошо видно на орографической карте. Его трекер перестал работать на северо-западе Италии, примерно в 100 км от границы с Францией. Трек его менее рационален (3360 и 2515 км, соотношение 1.34).

Маршрут молодой самки № 51 значительно отличается от двух предыдущих и выглядит “аномальным”: вскоре после начала миграции (на третьи сутки), пролетев район Курской магнитной аномалии, она резко изменила направление полета с юго-западного на северное без каких-либо видимых причин. Затем в течение нескольких дней самка меняла направление перелетов, постепенно вернувшись к юго-западному направлению. Ее трекер перестал работать на юге Польши, а трек оказался наименее рационален (2135 и 1439 км, соотношение 1.48).

Для всех трех особей гигантской вечерницы получены ежедневные координаты мест их дне-

вок во время миграции. Обе самки за время перелета не раз задерживались на некоторых дневках более чем на одни сутки (до 3 дней). Взрослая самка № 46 останавливалась во время миграции чаще всех (перелеты произошли лишь в 54% ночей от всей длительности перелета), но у нее же самые длинные перелеты в ночи полетов (в среднем 250 км за сутки). Самец № 53 ежедневно совершал перелеты и лишь в конце зафиксированного маршрута совершил остановку, прервав миграцию на одни сутки. После этого трекер разрядился и перестал передавать данные. У нас нет информации о том, продолжил ли затем самец свой миграционный перелет или завершил миграцию в районе последней точки трека.

В результате проведенного нами исследования впервые в ежедневном режиме на протяжении достаточно длительного периода получены данные о ходе сезонной миграции гигантской вечерницы.

Зимовка гигантской вечерницы, по-видимому, проходит в европейских странах со средиземноморским климатом, где известны их встречи в зимний период [11, 12]. Общее направление осенней миграции всех помеченных GPS-GSM трекерами особей гигантской вечерницы от мест летнего обитания на территории России было ориентировано на юго-запад, в южно-европейские страны. Оно соответствует известным данным для летучих мышей Европы и согласуется с генеральным направлением дальних миграций рукокрылых, выявленным на основе многочисленных возвратов окольцованных зверьков, в том числе близкого вида – рыжей вечерницы [3].

Осенняя миграция гигантской вечерницы происходит в сентябре, но конкретные даты ее начала зависят от состояния погоды. Помеченные нами зверьки начали миграцию 19 сентября (в 2020 г.) и 28 сентября (в 2021 г.).

За время перелета помеченные в России зверьки пересекли несколько стран. GPS-GSM трекеры, установленные на гигантских вечерницах, прекратили свою работу на юге Польши (самка № 51, 04.10.2020 г.; кроме России, она пересекла Белоруссию и Литву), на востоке Болгарии (самка № 46, 11.10.2021 г., ее полет проходил над территорией Украины, Молдавии и Румынии) и на северо-западе Италии, примерно в 100 км от границы с Францией (самец № 53, 16.10.2021 г.; он пересек Украину, Польшу, Чехию, Австрию и Словению).

Миграция гигантских вечерниц проходила по ночам с остановками на дневки, которые иногда продолжались более суток. Самка № 51 совершала перелеты 19–26, 28–29 сентября и 1–2 октября, дни остановок у нее приходились на 27, 30 сентября и 3 октября; самка № 46 совершала перелеты 28–30 сентября и 1–3, 7 октября, дни ее остановок – 4–6, 8–10 октября; самец № 53 совершал

перелеты 28–30 сентября и 1–14 октября, дни его остановок – 15 октября. Остановки продолжительностью более суток были связаны, по-видимому, с погодными условиями: при дожде и сильном ветре гигантские вечерницы не покидают свои убежища, что мы зарегистрировали и до начала миграции.

Характер маршрута зверьков во время миграции в значительной степени определяется орографией территории, над которой они пролетают. По наиболее оптимальному маршруту, близкому к прямой (соотношение 1.05), к месту зимовки летела взрослая самка № 46 (12 дней между точкой старта и финиша). Маршрут молодого самца № 53 был менее оптимален (соотношение 1.34), из-за чего его полет существенно затянулся (19 дней со дня старта до потери сигнала от трекера вблизи потенциального места зимовки). Средневысотные горы (от 1000 м и выше) оказались для него препятствием, а более высокие горы (высотой около 2000 м) после безуспешных попыток их преодолеть заставляли его изменять траекторию миграции. Самец № 53 был вынужден потратить часть времени и энергии на полеты вдоль северной оконечности гор Центральной Европы (Карпаты, Судеты), чтобы их облететь, но в конечном итоге он был вынужден все равно пересечь горы “в лоб”, перелетая Альпы там, где их высота была около 2000 м.

Среди трех полученных треков осенних миграционных перелетов гигантской вечерницы выделяются два нормальных (№ 46 и № 53) и один аномальный – траектория перелета молодой самки (№ 51) радикально отличается от двух других. Ее трек имеет S-образную форму и сильно отклоняется от оптимальной траектории (соотношение 1.48). В итоге при общей длине трека 2135 км расстояние по прямой между начальной и конечной точками составило всего 1439 км. На наш взгляд, аномальность траектории миграционного перелета этого зверька состоит в “расточительности” с точки зрения энергетических расходов во время перелета. Мы не обнаружили каких-либо очевидных причин, которые могли привести к такой аномальности – крупных орографических препятствий, динамики границы лесной зоны, направления пойм крупных рек и т.д. Единственное пространственное совпадение – Курская магнитная аномалия (КМА), после пересечения которой самка № 51 сменила оптимальное юго-западное направление миграции на северное.

Единственное объяснение обнаруженной нами аномалии трека, которое мы можем предложить – нарушения в работе магнитной компасной системы молодой самки после пролета над КМА и ее восстановление через несколько дней, когда зверек постепенно вернулся от северного направления перелета к юго-западному. Извест-

но, что рукокрылые подобно птицам могут использовать для ориентации магнитное поле [13]. Птицы могут использовать для ориентации несколько компасных систем и магнитная компасная система — лишь одна из них [14]. “Калибровка” компасных систем и умение выбирать “правильную” в каждом конкретном случае должно зависеть от жизненного опыта и индивидуальных особенностей особей.

Предложенное нами объяснение вызывает вопрос, почему КМА не сказалась на направлении полета пересекших ее двух других гигантских вечерниц. Возможно, разница в траекториях пересечения КМА была обусловлена ее пространственной неоднородностью [10, 15], либо индивидуальной изменчивостью реакции зверьков на аномалии магнитного поля КМА. Даже в нашей небольшой выборке из трех зверьков самый оптимальный, близкий к прямой, перелет совершила взрослая самка, минимизировав свои энергетические затраты.

Зимовки гигантских вечерниц в климатических условиях Польши, где перестал работать трекер самки № 51, не известны. Мы не исключаем того, что она продолжила свой путь на юг в более благоприятные для зимовки климатические условия (Болгария и Италия), как и две другие особи.

В результате использования GPS-GSM трекеров при изучении миграции гигантской вечерницей установлено несколько рекордов по дальности перелетов для рукокрылых. Максимальное расстояние, преодоленное гигантской вечерницей за сутки, составило 445 км, что сопоставимо с размерами некоторых стран. Это расстояние превышает известные суточные перелеты других видов рукокрылых [7], в частности лесного нетопыря [16], африканских и австралийских крыланов [5, 6]. Кроме того, на 30 км превышен предыдущий рекорд дальности миграции рукокрылых, принадлежавший лесному нетопырю *Pipistrellus nathusii* [17]: самец № 53 гигантской вечерницы преодолел расстояние в 2515 км по прямой (общая длина трека составила 3360 км). При этом дальнейший путь этого самца нам не известен и мы не можем исключить, что итоговая дистанция его миграционно-го перелета может быть еще больше.

Еще один аспект, который позволяют обсудить полученные нами данные по миграции гигантской вечерницы, касается предположения о характере генетической мономорфности этого вида. Обширный ареал гигантской вечерницы мозаичен и представлен множеством разрозненных микропопуляций [18], что предполагает наличие у них генетических отличий. Полученные нами данные позволяют предположить, что между этими микропопуляциями весьма вероятен интенсивный генетический обмен: особи даже из

удаленной, северо-восточной части ареала, осуществляют далекие миграционные перелеты, пролетая через центрально-европейские страны в южную Европу, и могут вносить свой генетический вклад в эти микропопуляции. Спаривание у *N. lasiopterus*, видимо, происходит осенью, как и у родственного вида, *Nyctalus noctula* — рыжей вечерницы [19]. Исследование генетической изменчивости рыжей вечерницы показало, что европейская популяция этого вида, несмотря на обширный ареал, растянувшийся через всю Европу на несколько тысяч километров, является генетически относительно мономорфной [20]. Дальнейшие исследования позволят проверить наше предположение и смогут уточнить, насколько удалены в генетическом плане пространственно разнесенные части популяции гигантской вечерницы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Irving A.T., Ahn M., Goh G., et al. // Nature. 2021. V. 589. P. 363–370.
2. Панютин К.К. // Итоги мечения млекопитающих. (Вопросы териологии). М.: Наука, 1980. С. 23–46.
3. Hutterer R., Ivanova T., Meyer-Cords C., Rodrigues L. Bat migrations in Europe – A review of banding data and literature (Naturschutz und Biologische Vielfalt, V. 28). Bonn: Federal Agency for Nature Conservation Publ., 2005. 180 p.
4. Ellison L.E. Summary and Analysis of the U.S. Government Bat Banding Program: U.S. Geological Survey Open-File Report 2008–1363, 2008. 117 p.
5. Richter H.V., Cumming G.S. // Journal of Zoology. 2008. V. 275. № 2. P. 172–176.
6. Welbergen J.A., Meade J., Field H. et al. // BMC Biol. 2020. 18. 101.
7. Dechmann D.K.N., Wikelski M., Varga K., Johannes E., Fiedler W., et al. // PLoS ONE. 2014. V. 9 (12). P. e114810.
8. Васеньков Д.А., Васильев Н.С., Сидорчук Н.В., Рожнов В.В. // Известия РАН. Серия биологическая. 2020. № 6. С. 665–672.
9. Alcaide J., Juste J. & Paunović M. 2016. *Nyctalus lasiopterus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. P e.T14918A22015318.
10. Петров О.В., Морозов А.Ф., Липилин А.В., и др. Центральный федеральный округ. Курская область. Карта Аномального магнитного поля. СПб.: ВСЕГЕИ, 2004 г.
11. Đaković M., Pavlinić I. // Natura Croatica: Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici. 2022. V. 31. № 2. P. 399–402.
12. Popa-Lisseanu A.G., Bontadina F., Mora O., Ibáñez C. // Animal behaviour. 2008. V. 75. № 2. С. 471–482.
13. Lindecke O., Holland R., Petersons G., Voigt C. // Communications Biology. 2021. V. 4. № 522. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02053-w>
14. Кушкинёв Д.А., Чернецов Н.С. // Журнал общей биологии. 2014. Т. 75. № 2. С. 104–123.

15. Ротанова Н.М., Харитонов А.Л., Фрунзе А.Х., Филиппов С.В., Абрамова Д.Ю. // Геомагнетизм и аэрономия. 2005. Т. 45. № 5. С. 712–719.
16. Weller T., Castle K., Liechti F., et al. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 34585.
17. Vasenkov D., Desmet J.F., Popov I., Sidorchuk N. // Mammalia. 2022. V. 86 (5). P. 524–526.
18. Dietz C., Kiefer A. Bats of Britain and Europe. London: Bloomsbury Publ., 2016. 400 p.
19. Racey P.A. // J. Reprod. Fert. 1974. V. 41. № 1. P. 169–182.
20. Petit E., Mayer F. // Proceedings. Biological sciences / The Royal Society. 1999. V. 266. P. 1717–22.

## AUTUMN MIGRATION OF THE GREATER NOCTULE BAT (*NYCTALUS LASIOPTERUS*): ACROSS COUNTRIES AND MOUNTAINS TO A NEW RECORD FOR THE RANGE OF SEASONAL FLIGHTS OF BATS

**D. A. Vasenkov<sup>a,#</sup>, N. S. Vasiliev<sup>b</sup>, N. V. Sidorchuk<sup>a</sup>, and Academician of the RAS V. V. Rozhnov<sup>a,##</sup>**

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

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

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

<sup>##</sup>*e-mail: rozhnov-v-2015@yandex.ru*

For the first time, using GPS-GSM trackers, long-term seasonal flights of greater noctule bat (*Nyctalus lasiopterus*) from summer habitats in Russia to wintering areas in Europe have been recorded. One of the seasonal migratory flights is a record distance for bats (2515 km). The maximum daily flight was 445 km. One of the animals abruptly changed the direction of migration from southwest to north on the third day of flight after crossing the Kursk magnetic anomaly.

*Keywords:* greater noctule bat, *Nyctalus lasiopterus*, seasonal migration, GPS-GSM trackers

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ СЕМЯН НА АКТИВНОСТЬ КАРБОАНГИДРАЗЫ, СКОРОСТЬ ФОТОСИНТЕЗА, УСТЬИЧНУЮ ПРОВОДИМОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИЗБЫТКЕ ЦИНКА

© 2023 г. А. А. Игнатенко<sup>1,\*</sup>, И. А. Нилова<sup>1</sup>, Е. С. Холопцева<sup>1</sup>,  
член-корреспондент РАН А. Ф. Титов<sup>1</sup>, Н. М. Казнина<sup>1</sup>

Поступило 08.08.2023 г.  
После доработки 30.08.2023 г.  
Принято к публикации 02.09.2023 г.

Изучали влияние обработки салициловой кислотой (СК) семян на активность карбоангидразы (КА), скорость фотосинтеза, устьичную проводимость и содержание пигментов в листьях пшеницы при оптимальном (2 мкМ) содержании цинка в корнеобитаемой среде или его избытке (1500 мкМ). Впервые показано, что при оптимальном содержании цинка обработка СК семян приводит к повышению по сравнению с необработанными растениями активности КА и увеличению устьичной проводимости, не сказываясь при этом на скорости фотосинтеза. При избытке цинка в корнеобитаемой среде обработка СК семян усиливала снижение активности КА, однако скорость фотосинтеза при этом была выше, чем у необработанных растений, очевидно, за счет повышения содержания хлорофиллов и каротиноидов, и увеличения устьичной проводимости. Сделан вывод, что СК, наряду с другими факторами негормональной природы и гормонами, принимает участие в защитно-приспособительных реакциях растений пшеницы на повышенное содержание цинка в окружающей среде.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., салициловая кислота, избыток цинка, карбоангидраза, фотосинтетические пигменты, устьичная проводимость

**DOI:** 10.31857/S2686738923700415, **EDN:** GQMEUD

Салициловая кислота (СК) является полифункциональным регулятором фенольной природы, который участвует во многих физиологических процессах у растений, включая дыхание, фотосинтез, транспирацию и водный обмен [1, 2]. Она также участвует в регуляции морфогенеза, движения устьиц, транспорта веществ, термогенеза, формировании устойчивости растений к патогенам и в их адаптации к некоторым абиотическим стрессорам, таким, в частности, как тяжелые металлы [1–3].

Известно, что одной из основных причин отрицательного воздействия тяжелых металлов на растения является нарушение структуры и функций фотосинтетического аппарата (ФСА), приводящее к торможению их роста и развития, и в конечном итоге к снижению продуктивности [3, 4].

Поэтому изучению защитного действия СК, направленного на поддержание активности ФСА в условиях избытка тяжелых металлов, уделяется в последние годы повышенное внимание. При этом обнаружено, что в присутствии таких металлов, как кадмий, ртуть или цинк обработка СК растений способствует поддержанию нативной ультраструктуры хлоропластов [5] и фотохимической активности фотосистем [6], а также необходимого уровня фотосинтетических пигментов [7, 8], что обеспечивает высокую скорость фотосинтеза [5]. Кроме того, обнаружено, что у обработанных СК растений, испытывающих кадмиевый стресс, экзогенная СК вызывает увеличение активности РУБИСКО и ФЕП-карбоксилазы [5].

В последнее время изучается роль СК в регуляции активности цинксодержащего фермента карбоангидразы (КА, КФ 4.2.1.1), который ускоряет взаимопревращение форм неорганического углерода и обеспечивает РУБИСКО молекулами CO<sub>2</sub> [9–11]. В листьях высших растений КА локализована в строме хлоропластов и цитоплазме и является одним из наиболее массовых белков, уступая по количеству только РУБИСКО [9]. Представители разных семейств КА ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -типы) участву-

<sup>1</sup>Институт биологии – обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Федерального исследовательского  
центра “Карельский научный центр Российской  
академии наук”, Петрозаводск, Россия

\*e-mail: angelina911@ya.ru

ют в дыхании и фотосинтезе, движении устьиц и биосинтезе липидов [9, 11]. Обсуждается также вовлечение КА в сигналинг СК, поскольку она относится к СК-связывающим белкам – SABPs (Salicylic Acid Binding Protein) [10–12]. Взаимодействие СК с КА (SABP3) приводит к изменению активности последней, однако, характер этих изменений может быть различным, в том числе в зависимости от условий роста растений [10, 13]. Например, обнаружено, что обработка СК мяты (*Mentha piperita* L.) вызывает увеличение активности КА в присутствии кадмия, что способствует поддержанию фотосинтетической активности и снижению негативного эффекта металла на растения [14]. В отношении возможного влияния СК на активность КА при избытке цинка в окружающей среде данные в известной нам литературе отсутствуют. Отмечаются только снижение активности КА в условиях дефицита цинка [11] и повышение ее активности при добавлении этого металла в среду роста [15].

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы было изучение влияния обработки СК семян на активность КА, скорость фотосинтеза, устьичную проводимость и содержание пигментов в листьях растений пшеницы, находящихся в условиях избытка цинка в корнеобитаемой среде.

Исследования проводили на растениях яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Злата. Семена были предоставлены ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Немчиновка”». Часть семян проращивали в течение трех суток на дистиллированной воде (вариант “без обработки”), другую часть – в течение первых суток выдерживали на растворе СК, затем отмывали и продолжали проращивать на дистиллированной воде (вариант “обработка СК семян”). Концентрация СК (100 мкМ) и длительность обработки (1 сут) были выбраны на основании предварительных опытов. Проклюнувшиеся семена обоих вариантов высаживали в пластиковые контейнеры (объемом 1.4 л) с питательным раствором Хогланда-Арнона с оптимальным (2 мкМ) или избыточным (1500 мкМ) содержанием цинка. Растения выращивали в камере искусственного климата при температуре 22°C, относительной влажности воздуха 60–70%, ФАР 180 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с) и 14-часовом фотопериоде в течение 11 сут. После чего в их листьях измеряли активность КА, интенсивность фотосинтеза, содержание фотосинтетических пигментов и устьичную проводимость.

Активность КА определяли по изменению оптической плотности реакционной смеси (100 мМ К-фосфатный буфер, рН 7.8 и 1.5 мМ рNPA) после добавления ферментного экстракта при 348 нм [16]. Измерение интенсивности фотосинтеза и устьичной проводимости проводили с использованием системы для исследования СО<sub>2</sub>-га-

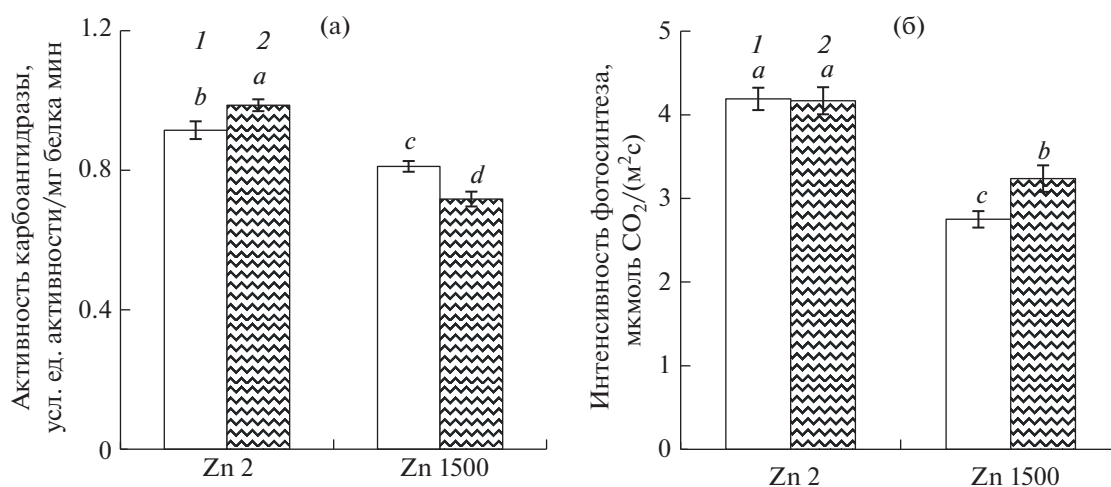
зообмена и водяных паров HCM-1000 (“Walz”, Германия). Скорость ассимиляции СО<sub>2</sub> измеряли при интенсивности ФАР 200 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с). Содержание пигментов определяли спектрофотометрически, экстрагируя их 80% ацетоном. Все измерения проводили на втором листе. Биологическая повторность составляла 3–5 растений в зависимости от показателя, аналитическая повторность – 3-кратная. Весь опыт повторяли дважды. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и PAST 4.0. Статистически значимо различающиеся величины каждого изученного показателя (при  $p < 0.05$ ) обозначены разными латинскими буквами.

В ходе исследований установлено, что при оптимальном содержании цинка (Zn 2) у растений пшеницы после обработки СК семян активность КА была несколько выше, чем у растений, семена которых не подвергались обработке (рис. 1а). Подобный эффект ранее был обнаружен при опрыскивании СК растений горчицы (*Brassica juncea* L. Czern & Coss) [17] и томата (*Lycopersicon esculentum* L.) [18] в оптимальных условиях роста.

При избытке цинка (Zn 1500) в корнеобитаемой среде активность КА снижалась как у необработанных СК растений, так и у обработанных, но у последних в большей степени (рис. 1а). Об отрицательном воздействии тяжелых металлов, включая цинк, на синтез ферментов, их структуру и функционирование в растительных клетках уже неоднократно указывалось ранее [3, 4, 19]. К примеру, присутствие в среде ионов свободного цинка вызывало существенное снижение эстеразной и фосфатазной активности у растений рапса (*Brassica napus* L.) [19]. Однако, как влияет СК на активность ферментов у растений в условиях избыточного содержания цинка, пока практически неизвестно. Результаты нашего исследования показали, что обработка СК усиливает ингибирующее действие избытка цинка на активность КА (рис. 1а). Как известно из литературы, СК в концентрациях, превышающих физиологические, может снижать активность КА, как это показано на растениях табака (*Nicotiana benthamiana* Domin) [12]. Можно предположить, что в условиях избытка цинка происходило повышение эндогенного уровня СК в клетках растений, что, например, наблюдалось ранее при действии других тяжелых металлов [1]. Кроме того, сама обработка могла усилить накопление СК вследствие гидролиза ее связанных форм или синтеза новых молекул.

В ходе экспериментов было также выявлено, что при оптимальном содержании цинка (Zn 2) обработка СК семян не сказывается на интенсивности фотосинтеза у пшеницы. Скорость этого процесса оказалась практически равной у расте-





**Рис. 1.** Активность карбоангидразы (а) и интенсивность фотосинтеза (б) в листьях пшеницы при оптимальном (2 мкМ) или избыточном (1500 мкМ) содержании цинка. Здесь и далее: 1 – растения выращены из семян, необработанных СК; 2 – растения выращены из семян, обработанных СК (100 мкМ).

ний в обоих вариантах опыта (рис. 1б). Избыток цинка (Zn 1500) вызывал заметное торможение (по сравнению с Zn 2) скорости этого процесса, причем у необработанных СК растений в большей степени, чем у обработанных (рис. 1б).

Поскольку скорость фотосинтеза во многом зависит от фотосинтетических пигментов, нами было определено содержание хлорофиллов и каротиноидов в листьях пшеницы. Обнаружено, что если при оптимальном содержании цинка (Zn 2) обработка СК семян не приводила к увеличению содержания изученных пигментов, то в условиях избытка металла (Zn 1500) их уровень превышал таковой у необработанных растений (табл. 1). Подобный эффект мог быть обусловлен участием СК в регуляции активности генов синтеза хлорофилла. В пользу этого предположения свидетельствуют, в частности, данные о повышении у обработанных СК растений мелиссы (*Melissa officinalis* L.) содержания транскриптов гена *CHLG*, кодирующего один из ферментов метаболизма хлорофилла – хлорофиллсинтазу, при действии ртути [7]. Нами также зафиксировано, что в условиях избытка цинка обработка СК семян спо-

собствовала увеличению по сравнению с необработанными растениями содержания в листьях каротиноидов (табл. 1), которые, как известно, не только участвуют в поглощении световой энергии, но и в защите клеток от негативного действия АФК [8].

Помимо пигментов, скорость фотосинтеза в значительной мере зависит от степени открытия устьиц и устьичной проводимости. В наших исследованиях при оптимальном содержании цинка (Zn 2) обработка СК приводила к повышению устьичной проводимости, а при избытке цинка (Zn 1500) в корнеобитаемой среде она обеспечивала меньшее по сравнению с необработанными растениями снижение устьичной проводимости (табл. 1), т.е. положительно сказывалась на активности ФСА в этих условиях. Заметим, что имеются данные о том, что в регуляции работы устьичного аппарата может участвовать КА. В частности, у двойного мутанта кукурузы (*Zea mays* L.) *ca1ca2* со сниженной активностью КА наблюдалась более высокая устьичная проводимость по сравнению с растениями дикого типа [20]. Поэтому нельзя исключить, что уменьшение активности КА, регистрируемое в наших опытах у растений в варианте с

**Таблица 1.** Содержание фотосинтетических пигментов и устьичная проводимость в листьях пшеницы при оптимальном (2 мкМ) или избыточном (1500 мкМ) содержании цинка

Показатель	Zn 2		Zn 1500	
	без обработки	обработка СК семян	без обработки	обработка СК семян
Содержание хлорофиллов (a+b), мг/г сухой массы	14.77 ± 0.32 <sup>a</sup>	14.26 ± 0.19 <sup>a</sup>	7.76 ± 0.17 <sup>c</sup>	8.40 ± 0.28 <sup>b</sup>
Содержание каротиноидов, мг/г сухой массы	2.75 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.74 ± 0.04 <sup>b</sup>
Устьичная проводимость, ммоль/(м <sup>2</sup> ·с)	45.42 ± 1.59 <sup>b</sup>	57.29 ± 2.48 <sup>a</sup>	33.20 ± 1.82 <sup>d</sup>	38.63 ± 0.70 <sup>c</sup>

обработкой СК семян, явилось одной из причин увеличения у них устьичной проводимости.

Таким образом, нами впервые обнаружено, что обработка СК семян приводит в дальнейшем в оптимальных условиях роста растений пшеницы к усилению (по сравнению с необработанными растениями) в листьях активности КА и увеличению устьичной проводимости, не сказываясь при этом на скорости фотосинтеза. При избытке в корнеобитаемой среде цинка у растений, выращенных из обработанных СК семян, наблюдается снижение активности КА, но скорость фотосинтеза при этом поддерживается на более высоком уровне, чем у необработанных растений, очевидно, за счет более высокого содержания хлорофиллов и каротиноидов, и устьичной проводимости. Кроме того, из полученных данных и анализа литературы можно, на наш взгляд, сделать также ряд обобщений. Во-первых, результаты проведенного исследования служат дополнительным аргументом в пользу представления о том, что устойчивость к тяжелым металлам, и избытку цинка в частности, складывается из большого числа защитно-приспособительных реакций [3, 4, 7], в которых наряду с другими факторами негормональной природы и гормонами принимает участие СК. Во-вторых, защитный эффект СК на растения носит достаточно пролонгированный характер, поэтому предпосевная обработка СК семян способна вызывать увеличение устойчивости растений пшеницы к избытку цинка, находящихся на более поздних стадиях развития. В-третьих, в селекционно-генетических исследованиях, направленных на выявление генотипов, отличающихся повышенной металлоустойчивостью, можно использовать в качестве одного из дополнительных диагностических признаков способность растений реагировать на избыток тяжелых металлов в окружающей среде усиленным образованием СК и/или характеризующихся повышенным содержанием СК в листьях.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность с.н.с., руководителю аналитической лаборатории Института леса КарНЦ РАН, к.б.н., К.М. Никеровой за помощь в освоении методов и и.о. зав. лабораторией селекции и первичного семеноводства озимой пшеницы ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», к.с.-х.н. Р.З. Мамедову за предоставленный для исследований семенной материал.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания FMEN-2022-0004 на научном оборудовании Центра коллективного пользования

Федерального исследовательского центра «Карельского научного центра Российской академии наук».

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Салициловая кислота и устойчивость растений к абиотическим стрессорам // Вісник Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєв. Серія Біологія. 2009. № 2. С. 19–39.
2. Kaur G., Tak Y., Asthir B. Salicylic acid: a key signal molecule ameliorating plant stresses // Cereal Res. Commun. 2022. V. 50. P. 617–626.
3. Sharma A., Singh G.P.S., Araniti F., et al. The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals // Molecules. 2020. V. 25. P. 540.
4. Singh S., Parihar P., Singh R., et al. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. P. 1143.
5. Moussa H., El-Gamal S.M. Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat // Biol. Plant. 2010. V. 54. P. 315–320.
6. Yotsova E.K., Dobrikova A.G., Stefanov M.A., et al. Improvement of the rice photosynthetic apparatus defence under cadmium stress modulated by salicylic acid supply to roots // Theor. Exp. Plant Physiol. 2018. V. 30. P. 57–70.
7. Safari F., Akramian M., Salehi-Arjmand H., et al. Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 183. P. 109542.
8. Quaglia M., Troni E., D'Amato R., et al. Effect of zinc imbalance and salicylic acid co-supply on Arabidopsis response to fungal pathogens with different lifestyles // Plant Biology. 2021. V. 4. P. 30–40.
9. Руденко Н.Н., Игнатова Л.К., Федорчук Т.П., и др. Карбоангидразы фотосинтезирующих клеток высших растений. Обзор // Биохимия. 2015. Т. 80. С. 798–813.
10. Medina-Puche L., Castelló M.J., Canet J.V., et al.  $\beta$ -carbonic anhydrases play a role in salicylic acid perception in Arabidopsis // PLoS ONE. 2017. V. 12. P. e0181820.
11. Polishchuk O.V. Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases // Planta. 2021. V. 253. P. 58.
12. Slaymaker D.H., Navarre D.A., Clark D., et al. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response // PNAS. 2002. V. 99. P. 11640–11645.
13. Hayat Q., Hayat S., Alyemeni M.N., et al. Plant physiology salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. // Plant Soil Environ. 2012. V. 58. P. 417–423.

14. Ahmad B., Jaleel H., Sadiq Y., et al. Response of exogenous salicylic acid on cadmium induced photosynthetic damage, antioxidant metabolism and essential oil production in peppermint // *Plant Growth Regul.* 2018. V. 86. P. 273–286.
15. Bingöl N.A., Akin B., Kocaçalışkan İ., et al. Effect of zinc on phytoremediation potential and carbonic anhydrase and polyphenoloxidase activities of *Lythrum salicaria* L. // *Turk. J. Bot.* 2021. V. 45. P. 553–562.
16. Bandyopadhyay T., Mehr P., Hairat S., et al. Morphophysiological and transcriptome profiling reveal novel zinc deficiency-responsive genes in rice // *Funct. Integr. Genomics.* 2017. V. 17. P. 565–581.
17. Fariduddin Q., Hayat S., Ahmad A. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea* // *Photosynthetica.* 2003. V. 41. P. 281–284.
18. Hayat S., Hasan S.A., Fariduddin Q., et al. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress // *J. Plant Interact.* 2008. V. 3. P. 297–304.
19. Zlobin I.E., Kartashov A.V., Kuznetsov V.I. Some plant enzymes are highly sensitive to inhibition by zinc ions // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 591–596.
20. Kolbe A.R., Brutnell T.P., Cousins A.B., et al. Carbonic anhydrase mutants in *Zea mays* have altered stomatal responses to environmental signals // *Plant Physiol.* 2018. V. 177. P. 980–989.

## INFLUENCE OF SEED TREATMENT WITH SALICYLIC ACID ON THE CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY, PHOTOSYNTHESIS RATE, STOMATAL CONDUCTANCE AND PIGMENTS CONTENT IN WHEAT LEAVES AT ZINC EXCESS

A. A. Ignatenko<sup>a,#</sup>, I. A. Nilova<sup>a</sup>, E. S. Kholoptseva<sup>a</sup>,  
Corresponding Member of the RAS A. F. Titov<sup>a</sup>, and N. M. Kaznina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation*  
<sup>#</sup>*e-mail: angelina911@ya.ru*

We studied the effect of seed treatment with salicylic acid (SA) on the carbonic anhydrase (CA) activity, photosynthesis rate, stomatal conductance and pigments content in wheat leaves at optimal zinc content (2 μM) or zinc excess (1500 μM). It was shown for the first time that at an optimal zinc content seed treatment with SA leads to an increase in CA activity and stomatal conductance compared to untreated plants without affecting the photosynthesis rate. At a zinc excess seed treatment with SA increased the decrease in CA activity, but the photosynthesis rate was higher than in untreated plants, apparently due to an increase in the chlorophylls and carotenoids content and stomatal conductivity. It is concluded that SA along with other non-hormonal factors and hormones, is involved in the protective and adaptive reactions of wheat plants to a zinc excess in the environment.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., salicylic acid, zinc excess, carbonic anhydrase, photosynthetic pigments, stomatal conductance

612.15 612.146.2

## СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ТОКСИНА WTX СНИЖАЮТ АРТЕРИАЛЬНОЕ ДАВЛЕНИЕ У КРЫС В СОСТОЯНИИ ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ

© 2023 г. М. С. Северюхина<sup>1,2</sup>, А. М. Исмаилова<sup>1</sup>, Э. Р. Шайхутдинова<sup>1</sup>, И. А. Дьяченко<sup>1</sup>, Н. С. Егорова<sup>3</sup>, А. Н. Мурашев<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН В. И. Цетлин<sup>3</sup>, Ю. Н. Уткин<sup>3,\*</sup>

Поступило 10.07.2023 г.  
После доработки 29.07.2023 г.  
Принято к публикации 29.07.2023 г.

Ранее нами было показано, что необычный токсин WTX из яда кобры *Naja kaouthia* при внутривенном введении вызывал снижение артериального давления (АД) и повышение частоты сердечных сокращений (ЧСС) у крыс (Ogay et al., 2005). Для идентификации участка молекулы токсина, отвечающего за эти эффекты, нами исследовано влияние синтетических пептидных фрагментов WTX на АД и ЧСС нормотензивных самцов крыс линии Sprague Dawley, находящихся в состоянии общей анестезии, вызванной препаратами Телазол и Ксилазин. Установлено, что пептиды, соответствующие центральной полипептидной петле WTX и стабилизированные дисульфидной связью, при внутривенном введении в концентрациях от 0.1 до 1.0 мг/мл вызывали продолжительное дозозависимое снижение АД. При этом ЧСС повышалась лишь в первые 5–10 мин после введения. Таким образом, фрагменты WTX, соответствующие центральной полипептидной петле, воспроизводят снижение АД, вызываемое токсином.

**Ключевые слова:** необычный токсин, WTX, артериальное давление, частота сердечных сокращений  
**DOI:** 10.31857/S2686738923600516, **EDN:** GTLMJI

### ВВЕДЕНИЕ

Токсин WTX из яда кобры *Naja kaouthia* относится к семейству трехпетельных токсинов [1, 2], состоит из 65 аминокислотных остатков и содержит пять дисульфидных связей (рис. 1) [3]. Один из дисульфидов расположен в N-концевой петле, что характерно для нетипичных (non-convention-al) токсинов змей [4]. WTX проявляет свойства как  $\alpha$ -нейротоксинов змей, так и мускариновых токсинов: он блокирует никотиновые холинорецепторы (нХР) мышечного ( $\alpha\beta\gamma\delta$ ) и  $\alpha 7$ -типа, а

также аллостерически взаимодействует с мускариновыми холинорецепторами [5]. Ранее было показано, что артериальное давление (АД) и частота сердечных сокращений (ЧСС) напрямую зависят от функции нХР, а активация или блокада различными агонистами или антагонистами приводит к изменениям гемодинамических параметров [6].

Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что наибольший вклад во взаимодействие с нХР вносит центральная петля II WTX (рис. 1) [7, 8]. Эта петля взаимодействует с ацетилхолин-связывающим карманом нХР, при этом петля I, предположительно, взаимодействует с мембраной, окружающей рецептор [8]. Важная роль петли II во взаимодействии с нХР была установлена ранее для  $\alpha$ -нейротоксинов змей [9, 10]. Показано также, что петля II WTX играет существенную роль во взаимодействии с мускариновым холинорецептором [11], и это согласуется с данными для мускариновых токсинов [12].

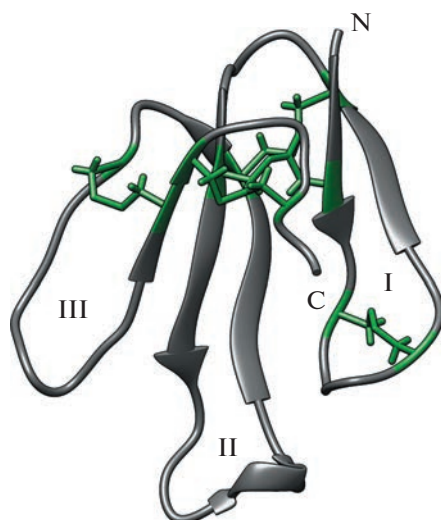
Ранее было установлено, что внутривенное введение WTX вызывает дозозависимое снижение артериального давления (АД) и повышение частоты сердечных сокращений (ЧСС), и в этом

<sup>1</sup>Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Московская область, Пушкино, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

\*e-mail: utkin@ibch.ru, utkin@yandex.ru



**Рис. 1.** Пространственная структура токсина WTX (аналог P33A), установленная методом ЯМР (код PDB – 2MJ0). N и C обозначают N- и C-концевые остатки соответственно. Римские цифры обозначают номера полипептидных петель. Дисульфидные связи показаны в виде стержней (выделены зеленым цветом).

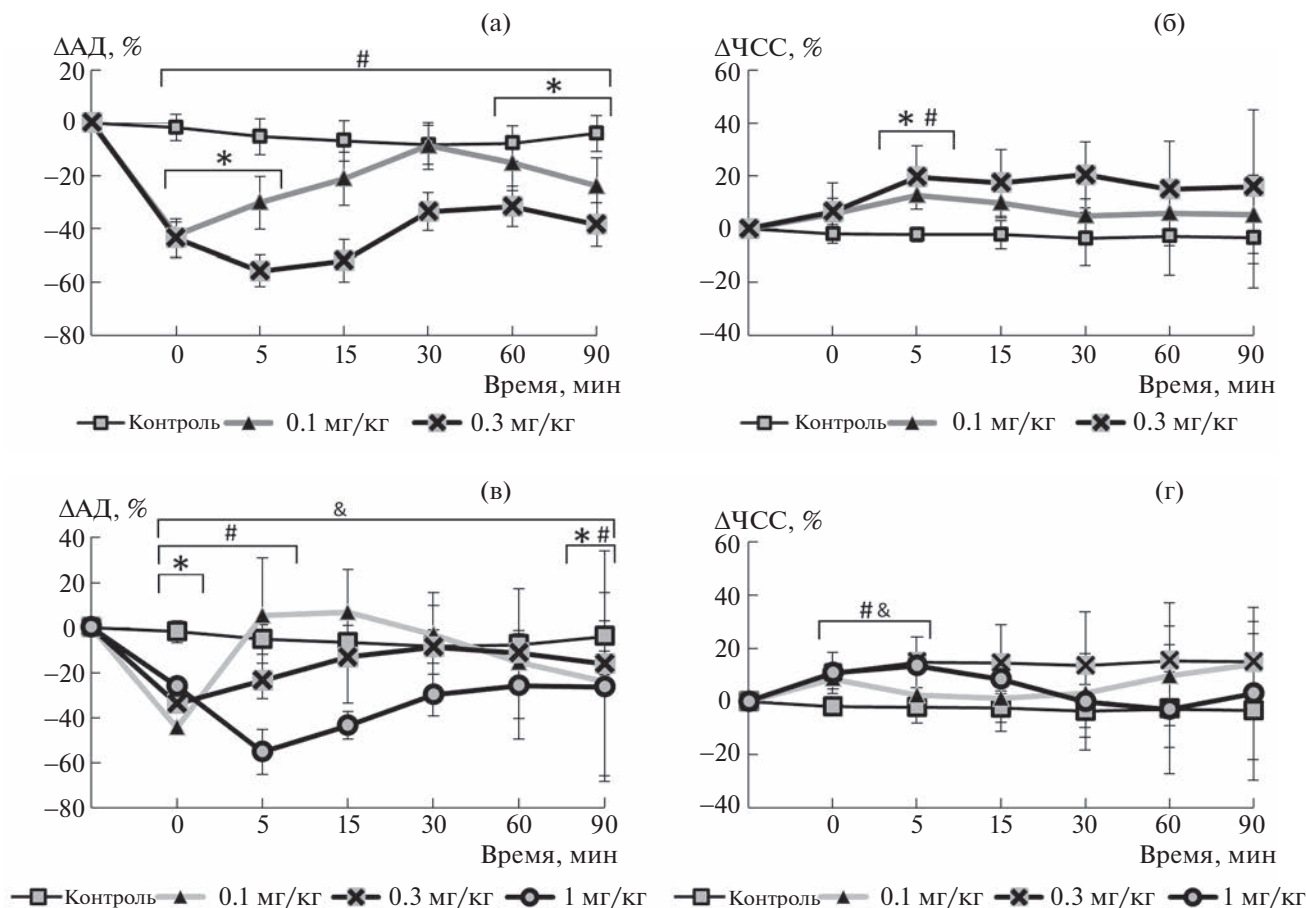
процессе участвуют холинергические рецепторы [13]. Учитывая тот факт, что полипептидная петля II WTX участвует во взаимодействии токсина с холинорецепторами, мы решили проверить, будут ли пептидные фрагменты аминокислотной последовательности WTX, соответствующие этой петле, оказывать влияние на АД и ЧСС. Следует отметить, что ранее синтетический фрагмент, включающий петлю II, циклизованную дисульфидными связями, был получен для нейротоксина кобры *N. naja philippinensis* [14]. Пептидный фрагмент сохранил способность взаимодействовать с нХР, присущую исходному токсину, хотя и гораздо менее эффективно. Методом пептидного синтеза были синтезированы два пептидных фрагмента токсина WTX (WTXf1 и WTXf2), N- и C-концевые участки которых соединены дисульфидной связью, и исследовано влияние этих пептидов на АД и ЧСС крыс, находящихся в условиях общей анестезии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды WTXf1 (17 а.о.) и WTXf2 (21 а.о.) получили методом твердофазного синтеза по методике, использованной ранее для синтеза фрагмента центральной петли трех-петельного белка человека; пространственная структура фрагмента была фиксирована введением дисульфида [15]. Чистоту пептидов подтверждали с помощью аналитической ВЭЖХ, а молекулярные массы определяли с помощью масс-спектрометрии. Молекулярная масса WTXf1 составила 2240.2 Да, а WTXf2 – 2618.4 Да, что в пределах ошибки измерений соответствует расчетным величинам.

В опытах использовали самцов крыс аутбредной линии Sprague-Dawley статуса SPF с массой тела 250–300 г (НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН). Все процедуры были одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 910/22). Для исследования отобрали животных с исходным значением АД в пределах 100–140 мм. рт.ст., соответствующим норме [16]. Животным под наркозом препаратами телазол (4 мг/кг) и ксилазин (12 мг/кг, внутримышечно) [17] через надрез на вентральной стороне шеи имплантировали катетеры в общую сонную артерию и яремную вену. Исследуемые вещества и растворитель (физиологический раствор) вводили через внутривенный катетер в объеме 1 мл/кг. Для регистрации АД и ЧСС прямым способом артериальный катетер подключали к установке Powerlab ML125 (AD Instrument, Australia).

Животных распределяли на 7 групп: 1 группа – контроль с введением физиологического раствора ( $n = 6$ ); 2–4 группы – введение WTXf1 в концентрациях 0.1 мг/кг ( $n = 6$ ), 0.3 мг/кг ( $n = 3$ ) и 1 мг/кг ( $n = 1$ ); 5–7 группы – WTXf2 в концентрациях 0.1 мг/кг ( $n = 3$ ), 0.3 мг/кг ( $n = 6$ ) и 1 мг/кг ( $n = 3$ ) соответственно. Эксперимент ставился в условиях общей анестезии (телазол + ксилазин). После 15-минутной регистрации исходных значений (baseline) АД и ЧСС через венозный катетер животным вводили препарат согласно групповой принадлежности и продолжали регистрировать параметры в течение 90 мин после введения веществ.



**Рис. 2.** Изменения АД (а, в) и ЧСС (б, г) при внутривенном введении крысам пептидов WTXf1 (а, б) и WTXf2 (в, г). \*  $p \leq 0.05$  по U-критерию Манна–Уитни для групп WTXf1 (0.1 мг/кг) и WTXf2 (0.1 мг/кг) в сравнении с контрольной группой; #  $p \leq 0.05$  по U-критерию Манна–Уитни для групп WTXf1 (0.3 мг/кг) и WTXf2 (0.3 мг/кг) в сравнении с контрольной группой. &  $p \leq 0.05$  по U-критерию Манна–Уитни группы WTXf2 (1 мг/кг) в сравнении с контрольной группой.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

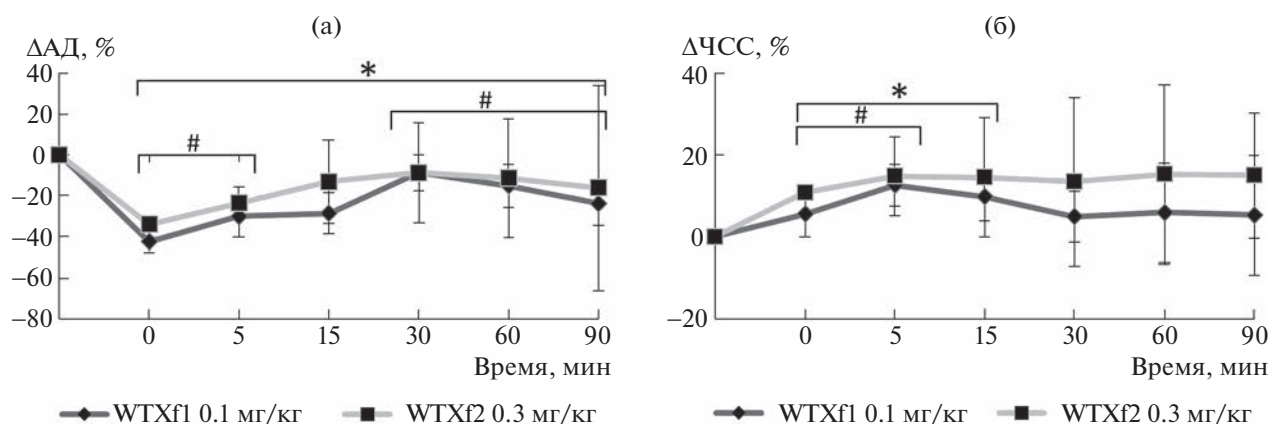
В проводившихся ранее экспериментах крысам вводили WTX в дозах 0.5, 1 и 2 мг/кг [13]. Мы начали исследование активности синтетических пептидов с дозы 1 мг/кг. При введении животному пептида WTXf1 в такой дозе произошло катастрофическое падение давления до 40 мм. рт. ст., сопровождавшееся гибелью животного. Вследствие этого более детального исследования WTXf1 в дозе 1 мг/кг не проводили.

При введении WTXf1 в дозе 0.3 мг/кг в первые пять минут наблюдалось резкое падение АД более чем на 50%; затем оно постепенно увеличивалось, но оставалось сниженным на 30% от исходных значений. Примерно через 30 мин после введения начался повторный спад АД, к концу регистрации значения также были на 45% ниже исходной величины (рис. 2а). Необходимо отметить, что два животных из этой группы погибли сразу после эксперимента, поэтому дальнейшее исследование WTXf1 в этой дозе было остановлено.

При введении WTXf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось резкое падение АД на 40% ниже исходного значения, однако к 25-й минуте оно практически вернулось к начальному уровню. После 25-й минуты регистрации АД достоверно снизилось и стабильно оставалось сниженным на 25% ниже исходного уровня до конца регистрации (рис. 2а).

На протяжении всего времени регистрации показателей, достоверных изменений АД у животных в контрольной группе не наблюдалось.

Введение WTXf2 в дозе 1 мг/кг привело к достоверному падению АД на 45% от исходных значений на 5-й минуте. До 40-й минуты давление имело тенденцию к восстановлению, но оставалось достоверно сниженным на 27% от исходного уровня до конца регистрации (рис. 2в). Введение WTXf2 в дозе 0.3 мг/кг вызвало падение АД на 31% в первую минуту регистрации с последующим восстановлением до 87% от исходных значений на 20-й минуте. Далее АД оставалось достоверно сниженным до конца записи (80–83% от



**Рис. 3.** Сравнение влияния WTxf1 и WTxf2 в дозах 0.1 и 0.3 мг/кг, соответственно, на АД (а) и ЧСС (б). \*  $p \leq 0.05$  для WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг по сравнению с исходными значениями (Т-тест для зависимых выборок), #  $p \leq 0.05$  для WTxf2 в дозе 0.3 мг/кг по сравнению с исходными значениями (Т-тест для зависимых выборок).

исходных значений к 90-й минуте) (рис. 2в). Введение WTxf2 в дозе 0.1 мг/кг привело к падению АД на 45% в первую минуту с восстановлением до исходных значений в течение 3–4 мин. Далее наблюдалось кратковременное повышение АД на 5%, которое не являлось статистически достоверным и продолжалось до 15-й минуты после введения препарата. Затем АД постепенно снижалось на 26% по сравнению с исходными значениями в конце регистрации (рис. 2в).

В контрольной группе после введения физиологического раствора не наблюдалось статистически значимых изменений ЧСС в течение всего периода регистрации.

В группах с введением WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось статистически значимое повышение ЧСС относительно контрольной группы на 5–10-й минутах записи и на 5-й минуте в дозе 0.3 мг/кг (рис. 2б). В группах, которым вводили WTxf1 в дозах 0.3 и 1 мг/кг, ЧСС статистически значимо повышалась до 5-й минуты регистрации (рис. 2г), тогда как в группе с введением WTxf2 в дозе 0.1 мг/кг статистически значимых различий относительно контрольной группы не наблюдалось.

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее перспективными для дальнейшего более детального исследования являются дозы 0.1 и 0.3 мг/кг для WTxf1 и WTxf2 соответственно. Нами проведено сравнение влияния этих доз на АД и ЧСС (рис. 3). В общем наблюдаемые эффекты достаточно похожи. Однако имеются и некоторые различия. Так, для WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось статистически значимое снижение АД на протяжении всего эксперимента, в то время как WTxf2 в дозе 0.3 мг/кг вызывал статистически значимое снижение АД с 1-й по 10-ю минуту и с 30-й минуты до конца регистрации (рис. 3а). Статистически значимое повышение ЧСС отно-

сительно исходных значений для WTxf1 в дозе 0.1 мг/кг наблюдалось с 1-й до 20-й минуты после введения, для WTxf2 в дозе 0.3 мг/кг лишь с 1-й по 5-ю минуту (рис. 3б). Таким образом, влияние WTxf1 более выражено и требует меньших доз для достижения сходных изменений АД по сравнению с WTxf2. Однако WTxf1 в дозах 0.3 и 1 мг/кг в условиях наркоза оказывает стойкое снижение АД и проявляет токсические свойства. Критическое снижение АД может указывать на дозозависимое угнетающее действие WTxf1 на вазоконстрикторный эффект симпатической нервной системы [18]. Интересно отметить, что эффективная доза WTxf1 (0.1 мг/кг = 0.045 мкмоль/кг) существенно ниже, чем у известных низкомолекулярных препаратов: 6.0–15.0 мкмоль/кг для фентоламина [19, 20] и 20.0–80.0 мкмоль/кг для каптоприла [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе исследования различных доз двух исследуемых фрагментов токсина WTХ на крысах линии Sprague-Dawley, в состоянии наркоза, выявили дозозависимое гипотензивное действие с первой минуты введения, что указывает на способность каждого из фрагментов оказывать прямое миотропное действие на сосуды. Также установлено, что введение фрагментов WTХ статистически значимо повышает показатели ЧСС в первые 5–10 мин после введения с последующим быстрым возвращением к первоначальным значениям. Таким образом, фрагменты WTХ, соответствующие аминокислотной последовательности центральной петли токсина, проявляют гипотензивное действие, наблюдавшееся ранее для целого токсина [13]. Поскольку исследованные пептиды составляют менее 1/3 аминокислотной последовательности

WTX, они являются более перспективными в качестве основы для создания лекарственных препаратов, чем сам токсин. Особенно это касается более короткого пептида WTXf1, обладающего к тому же большей активностью.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках научно-го проекта № 21-14-00316.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных одобрены комиссией ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных (протокол-заявка № 766/20).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kessler P., Marchot P., Silva M., et al.* The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. // *J. Neurochem.* 2017. V. 142. Suppl. 2. P. 7–18.
2. *Nirthanan S.* Snake three-finger  $\alpha$ -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. // *Biochem. Pharmacol.* 2020. V. 181. P. 114168.
3. *Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Kryukova E.V., et al.* “Weak toxin” from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of alpha 7 and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 19. P. 15810–15815.
4. *Nirthanan S., Gopalakrishnakone P., Gwee M.C., et al.* Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon.* 2003. V. 41. № 4. P. 397–407.
5. *Mordvintsev D.Y., Polyak Y.L., Rodionov D.I., et al.* Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS J.* 2009. V. 276. № 18. P. 5065–5075.
6. *Janssen B.J., Leenders P.J., Smits J.F.* Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. V. 278. № 1. P. R215–R225.
7. *Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., et al.* Central loop of non-conventional toxin WTX from *Naja kaouthia* is important for interaction with nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon.* 2016. V. 119. P. 274–279.
8. *Shenkarev Z.O., Chesnokov Y.M., Zaigraev M.M., et al.* Membrane-mediated interaction of non-conventional snake three-finger toxins with nicotinic acetylcholine receptors. *Commun. Biol.* 2022. V. 5. №1. P. 1344.
9. *Fruchart-Gaillard C., Gilquin B., Antil-Delbeke S., et al.* Experimentally based model of a complex between a snake toxin and the alpha 7 nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002. V. 99. № 5. P. 3216–3221.
10. *Nys M., Zarkadas E., Brams M., et al.* The molecular mechanism of snake short-chain  $\alpha$ -neurotoxin binding to muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 4543.
11. *Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., et al.* Structural Insight into Specificity of Interactions between Nonconventional Three-finger Weak Toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and Muscarinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 39. P. 23616–23630.
12. *Marquer C., Fruchart-Gaillard C., Letellier G., et al.* Structural model of ligand-G protein-coupled receptor (GPCR) complex based on experimental double mutant cycle data: MT7 snake toxin bound to dimeric hM1 muscarinic receptor. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 36. P. 31661–31675.
13. *Ogay A.Y., Rzhnevsky D.I., Murashev A.N., et al.* Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting on acetylcholine receptors. // *Toxicon.* 2005. V. 45. № 1. P. 939–939.
14. *Juillerat M.A., Schwendimann B., Hauert J., et al.* Specific binding to isolated acetylcholine receptor of a synthetic peptide duplicating the sequence of the presumed active center of a lethal toxin from snake venom. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 6. P. 2901–2907.
15. *Mineev K.S., Kryukova E.V., Kasheverov I.E., et al.* Spatial Structure and Activity of Synthetic Fragments of Lynx1 and of Nicotinic Receptor Loop C Models. // *Biomolecules.* 2020. V. 11. № 1. P. 1.
16. *Шаманаев А.Ю., Алиев О.И., Анищенко А.М., и др.* Показатели сердечной деятельности у крыс линии SHR до и после установления стабильно высокого артериального давления // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016. № 4–6. С. 1115–1118.
17. *Кадомцев Д.В., Пасечникова Е.А., Голубев В.Г.* Золетил-ксилазиновый наркоз в экспериментах у крыс // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015. № 5–1. С. 56–57.
18. *Haass M., Kübler W.* Nicotine and sympathetic neurotransmission. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1997. V. 10. № 6. P. 657–665.
19. *Muntzel M.S., Abe A., Petersen J.S.* Effects of adrenergic, cholinergic and ganglionic blockade on acute depressor responses to metformin in spontaneously hypertensive rats. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. V. 281. № 2. P. 618–623.
20. *Holte H.R., Bjørnstad-Ostensen A., Berg T.* The role of endogenous bradykinin in blood pressure homeostasis in spontaneously hypertensive rats. // *Br. J. Pharmacol.* 1996. V. 118. № 8. P. 1925–1930.
21. *Sharma J.N., Amrah S.S., Noor A.R.* Suppression of hypotensive responses of captopril and enalapril by the kallikrein inhibitor aprotinin in spontaneously hypertensive rats. // *Pharmacology.* 1995. V. 50. № 6. P. 363–369.



## SYNTHETIC PEPTIDE FRAGMENTS OF THE TOXIN WTX REDUCE BLOOD PRESSURE IN RATS UNDER GENERAL ANESTHESIA

M. S. Severyukhina<sup>a,b</sup>, A. M. Ismailova<sup>a</sup>, E. R. Shaykhutdinova<sup>a</sup>, I. A. Dyachenko<sup>a</sup>, N. S. Egorova<sup>c</sup>, A. N. Murashev<sup>a</sup>, Corresponding Member of the RAS V. I. Tsetlin<sup>c</sup>, and Yu. N. Utkin<sup>c,#</sup>

<sup>a</sup>Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russian Federation

<sup>b</sup>Pushchino State Natural-Science Institute, Pushchino, Russian Federation

<sup>c</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: utkin@ibch.ru, yutkin@yandex.ru

Previously, it was shown that the non-conventional toxin WTX from the venom of the cobra *Naja kaouthia*, when administered intravenously, caused a decrease in blood pressure (BP) and an increase in heart rate (HR) in rats (Ogay et al., 2005). To identify the site of the toxin molecule responsible for these effects, we studied the influence of synthetic peptide fragments of the WTX on BP and HR in normotensive male Sprague Dawley rats under general anesthesia induced by Telazol and Xylazine. It was found that peptides corresponding to the WTX central polypeptide loop, stabilized by a disulfide bond, at intravenous injection at concentrations from 0.1 to 1.0 mg/ml caused a dose-dependent decrease in BP, the HR increasing only in the first 5–10 minutes after administration. Thus, WTX fragments corresponding to the central polypeptide loop reproduce the decrease in blood pressure caused by the toxin.

*Keywords:* non-conventional toxin, WTX, blood pressure, heart rate

УДК 577.29

## УРОВЕНЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО МОНОФОСФАТА ГЕМЦИТАБИНА ПРЕДСКАЗЫВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИОТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕМЦИТАБИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

© 2023 г. М. Р. Янова<sup>1,\*</sup>, А. П. Жиянов<sup>1</sup>, И. Д. Антипенко<sup>1</sup>, С. А. Слободов<sup>1</sup>, Е. В. Степанова<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН Н.Е. Кушлинским

Поступило 20.05.2023 г.

После доработки 08.08.2023 г.

Принято к публикации 10.08.2023 г.

Монофосфат гемцитабина (dFdCMP) является одной из форм фосфорилированного гемцитабина, образующихся внутри клеток и определяющих его противоопухолевую активность. Разработана фармако-молекулярная модель определения относительного уровня монофосфата гемцитабина, основанная на оценке активности каналов ENT1, ENT2 и ферментов dCK, CDA в ткани опухоли. Относительный уровень монофосфата гемцитабина является более значимым фактором прогноза прогрессирования рака мочевого пузыря при химиотерапии с использованием гемцитабина, чем экспрессия отдельных маркеров, влияющих на образование его активной формы.

*Ключевые слова:* рак мочевого пузыря, гемцитабин, цитотоксичность, математическая модель

DOI: 10.31857/S2686738923600140, EDN: GUAXOE

### ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) занимает 8-е место по распространенности и 13-е место по смертности среди всех видов злокачественных новообразований [1, 2]. Стандартом химиотерапии РМП на данный момент является терапия комбинацией цисплатина и гемцитабина [1], которая эффективна только в 30–60% случаев [3]. Одним из подходов к повышению эффективности лечения пациентов РМП и снижению их смертности является поиск маркеров предсказания чувствительности и/или резистентности к проводимому лечению.

Гемцитабин (Гемзар) является нуклеозидным аналогом цитозина арабинозида (2'-дифтордезоксцитидин) и широко используется для терапии рака поджелудочной железы, мочевого пузыря, молочной железы, яичников, немелкоклеточного рака легкого [4]. Его противоопухолевый эффект связан с внедрением гемцитабин трифосфата в ДНК вместо цитидин трифосфата, что приводит к нарушению репликации опухолевых клеток и вызывает клеточную гибель путем апоптоза [5]. 95% транспорта гемцитабина через цитоплазматическую мембрану клеток обеспечива-

ют транспортеры нуклеозидов семейства эквilibративных переносчиков нуклеотидов (ENTs) и концентрационных переносчиков нуклеотидов (CNTs) [6]. Из них только ENT1 и ENT2 имеют высокую экспрессию в ткани РМП. Внутри клетки препарат подвергается серии последовательных фосфорилирований дезоксицитидинкиназой (dCK) до его активных фосфатных форм. Фосфорилирование dCK является лимитирующей стадией, от которой зависит скорость дальнейшей активации гемцитабина и его транспорта из клетки [5]. Внутриклеточный гемцитабин также подвергается инактивации ферментом CDA внутри клетки с образованием менее токсичной формы, которая в дальнейшем выбрасывается из клетки.

Несколько клинических исследований показали, что экспрессия мРНК/белков ENT1, ENT2, dCK и CDA в опухолевых тканях может быть прогностическим маркером течения болезни у онкологических пациентов, получавших гемцитабин при раке поджелудочной железы [7–9], желчного пузыря [10], легкого [11]. Однако экспрессия данных маркеров малоизучена при РМП.

Учитывая вовлечение в процесс формирования активной формы гемцитабина нескольких транспортеров и ферментов, нами была создана фармако-молекулярная модель определения интегрального показателя уровня монофосфата гемцитабина (уровень dFdCMP) – одной из его

<sup>1</sup>НИУ Высшая школа экономики,  
Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия  
\*e-mail: myanova@hse.ru

**Таблица 1.** Кинетические параметры, используемые для подсчета dFdCMP

Параметр	Значение
$k_M, ENT1$	160 мкМ [15]
$k_M, ENT2$	740 мкМ [15]
$V_{max}, ENT1$	0.000009 мкМ/ч [15]
$V_{max}, ENT2$	0.000258 мкМ/ч [15]
$k_M, dCK$	4.6 мкМ [13]
$V_{max}, dCK$	0.145 мкМ/ч [13]
$k_M CDA, int$	0.0434 мкМ [13]
$V_{max} CDA, int$	0.11 мкМ/ч [13]

активных форм, основанная на работе каналов ENT1, ENT2 и ферментов dCK, CDA. В нашем исследовании изучена значимость определения уровня dFdCMP в опухоли для предсказания эффективности химиотерапии с использованием гемцитабина у пациентов РМП.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование клинической значимости биомаркеров были включены пациенты с РМП, получающие лечение химиотерапией с использованием гемцитабина, из ретроспективной базы данных проекта Атласа генома опухолей (The Cancer Genome Atlas Project (TCGA)) [12]. Данные о результатах секвенирования и клиническая информация о пациентах были доступны в базах данных TCGA и cBioPortal (TCGA, PanCancer Atlas), <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-BLCA>. Профили экспрессии генов у пациентов с раком мочевого пузыря, получающих химиотерапию с использованием гемцитабина и препаратов группы платины (исходные данные в виде рид-каунтов), были загружены из базы данных TCGA и нормализованы методом FPKM (фрагменты на килобазу на миллион картированных прочтений) при помощи языка программирования Python. Клинические данные пациентов (пол, возраст, степень злокачественности опухоли, стадия заболевания, исход болезни (прогрессирование, смерть пациента) в период наблюдения и срок наступления соответствующего события) также были загружены из базы данных TCGA.

В исследование включено 68 пациентов с РМП: 44 – мужчины и 22 женщины (соотношение 2:1). Средний возраст больных на момент постановки диагноза составил 66 лет, из них до 60 лет – 12, и старше 60 лет – 56 человек. Большинство больных (70%) на момент постановки диагноза имели III и IV стадию болезни. Все пациенты имели мышечно-инвазивный рак и им была проведена операция по поводу удаления

первичной опухоли. Больные получали химиотерапевтическое лечение с использованием гемцитабина, из них 52 получали комбинацию гемцитабина и цисплатина; 13 – гемцитабина и карбоплатина; 3 – гемцитабина.

Полный ответ на химиотерапию (CR) по критериям ответа опухоли на терапию RECIST наблюдался в 44% случаев, частичный ответ – в 12%, стабилизация болезни – в 12% и прогрессирование болезни (PD) – в 32% случаев. Все больные были прослежены в течение 2 лет или до наступления смерти больного. Среди них прогрессирование болезни наблюдалось у 46% (медиана времени до прогрессирования составила 15.7 мес (от 3.4 до 24.0)), у 54% больных прогрессирования обнаружено не было. 68% пациентов были живы на момент окончания наблюдения.

В соответствии с работой [13], скорости изменения концентрации монофосфатной формы, вне- и внутриклеточная концентрации гемцитабина описываются системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} Gem_{ext}'(t) = & Gem_{iv}'(t) - \\ & - V_{ENT1} (Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT1} - \\ & - V_{ENT2} (Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT2} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} Gem_{int}'(t) = & V_{ENT1} (Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT1} + \\ & + V_{ENT2} (Gem_{ext}(t) - Gem_{int}(t)) \cdot e_{ENT2} - \\ & - V_{ENT2} - V_{CDA} (Gem_{int}(t)) \cdot e_{CDA} \end{aligned} \quad (2)$$

$$dFdCMP'(t) = V_{dCK} (Gem_{int}(t)) \cdot e_{dCK}, \quad (3)$$

где  $V_x$  – константы активности фермента  $x$  из уравнения Михаэлиса-Ментен,  $e_x$  – экспрессия фермента  $x$ ,  $Gem_{ext}(t)$ ,  $Gem_{int}(t)$  – вне- и внутриклеточная концентрация гемцитабина в момент времени  $t$ ,  $dFdCMP(t)$  – внутриклеточная концентрация монофосфатной формы гемцитабина,  $Gem_{iv}$  – “введенная” концентрация гемцитабина. Скорость проникновения фермента описывали уравнением Михаэлиса-Ментен. В качестве значений внешней концентрации препарата в ткани опухоли брали значения концентрации гемцитабина в плазме крови пациентов при введении однократной дозы 3.34 ммоль/м<sup>2</sup> в течение 30 мин (стандартное введение в клинических условиях), приведенные в статье [13].

Для численного решения системы (1–3) использовали язык программирования Python, пакет “integrate” библиотеки SciPy [14]. Для оценки накопленной концентрации dFdCMP брали значение численного решения в точке времени  $t = 3.72$  ч. Коэффициенты, необходимые для подсчета относительного уровня монофосфатной формы гемцитабина, приведены в табл. 1.

Статистический анализ результатов осуществляли в программе Python с использованием кри-

**Таблица 2.** Взаимосвязь маркеров и dFdCMP с ответом на химиотерапию

Ответ опухоли на химиотерапию	Медиана экспрессии	Пациенты с низкой экспрессией/у.е., <i>n</i>	Пациенты с высокой экспрессией/у.е., <i>n</i>
<b>ENT1</b>			
CR	4.56	12	18
PD	4.12	13	9
<i>p</i> -значение	0.43	0.26	
<b>ENT2</b>			
CR	2.07	17	13
PD	2.46	10	12
<i>p</i> -значение	0.19	0.58	
<b>dCK</b>			
CR	3.03	16	14
PD	3.06	9	13
<i>p</i> -значение	0.56	0.41	
<b>CDA</b>			
CR	1.91	17	13
PD	3.42	8	14
<i>p</i> -значение	0.19	0.17	
<b>dFdCMP</b>			
CR	0.0077	13	17
PD	0.0040	16	6
<i>p</i> -значение	0.23	0.049	

териев Манна–Уитни, логранга, а также точного теста Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературы известно, что трифосфатная форма гемцитабина может быть использована в качестве основного прогностического маркера общей выживаемости пациентов с раком поджелудочной железы [16]. Определение уровня dFdCMP было выбрано с учетом того, что его выведение из клетки минимально, и при этом его концентрация соответствует концентрации гемцитабин трифосфата [15].

Интегральный показатель уровня dFdCMP был подсчитан в клетках 68 пациентов с РМП с использованием разработанной модели и в среднем составил 0,018 (95% CI 0.011–0.025) условных единиц (у.е.). Данные о корреляции dFdCMP и ответом опухоли на химиотерапию представлены в табл. 2.

При данном объеме выборки не обнаружено значимой корреляции между значениями медианы уровней маркеров или уровнем dFdCMP и ответом опухоли на химиотерапию (полный ответ (CR) vs прогрессирование (PD)). Однако была от-

мечена тенденция к снижению вероятности ответа на химиотерапию при низких уровнях CDA ( $p = 0.19$ ), dFdCMP ( $p = 0.23$ ) и высоких уровнях ENT2 ( $p = 0.19$ ). Также была обнаружена тенденция к более раннему прогрессированию опухоли (в течение 12 мес) после начала химиотерапии при низких значениях экспрессии CDA ( $p = 0.14$ ) и уровня dFdCMP ( $p = 0.0995$ ).

Клиническую значимость экспрессии маркеров ENT1, ENT2, dCK, CDA и относительного уровня dFdCMP оценивали по ответу опухоли на проводимую химиотерапию с использованием гемцитабина (полный ответ vs прогрессия) и по длительности времени до прогрессирования болезни. Все пациенты были разделены на подгруппы с низкой (<50% от значений экспрессии/у.е., I–II квартиль) и высокой экспрессией маркеров/уровнем dFdCMP (>50% от значений экспрессии/уровня, III–IV квартиль).

Малый объем выборки не позволил выявить корреляцию ответа на терапию гемцитабином с уровнем экспрессии маркеров ENT1, ENT2, dCK и CDA, однако, была отмечена тенденция к увеличению вероятности ответа на химиотерапию у пациентов с низкой экспрессией CDA ( $p = 0.17$ ). Была выявлена взаимосвязь между пониженной

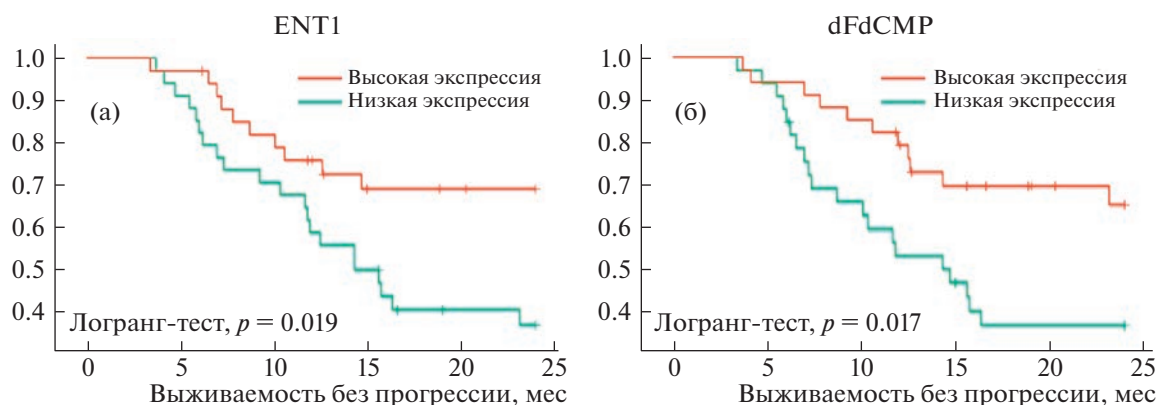


Рис. 1. Взаимосвязь (а) высокой/низкой экспрессии ENT1 и (б) высокого/низкое относительное значение dFdCMP с выживаемостью без прогрессии.

вероятностью ответа на химиотерапию и низким относительным уровнем dFdCMP ( $p = 0.049$ ). Время до прогрессирования болезни было меньше у пациентов, имеющих низкую экспрессию ENT1: медиана времени до прогрессирования составила  $14.9 \pm 2.5$  мес у пациентов с низкой экспрессией и не достигнута у пациентов с высокой экспрессией ( $p = 0.019$ ) (рис. 1а).

При этом интегральный показатель dFdCMP, определенный с помощью разработанной фармако-молекулярной модели, имел более высокую предсказывающую значимость. Так, у пациентов, имеющих низкий расчетный уровень dFdCMP, медиана времени до прогрессирования составила  $14.5 \pm 3.7$  мес, в то время как у пациентов, имеющих высокий расчетный уровень dFdCMP, достигнута не была ( $p = 0.017$ ) (рис. 1б). Дополнительный статистический анализ показал, что экспрессия маркеров и относительный уровень dFdCMP не коррелируют со временем до метастазирования и общей выживаемостью больных.

Таким образом, предсказывающее значение транспортера ENT1 для прогрессирования пациентов с РМП, получавших химиотерапию с использованием гемцитабина, требует дополнительного изучения. Несмотря на то что в нашей работе были использованы данные секвенирования мРНК интересующих транспортеров и ферментов для отображения их индивидуального вклада в метаболизм препарата у больных РМП, упрощенная фармако-молекулярная модель определения относительного уровня dFdCMP позволила установить, что он является более значимым фактором прогноза прогрессирования РМП при химиотерапии с использованием гемцитабина, чем экспрессия отдельных маркеров, влияющих на образование его активной формы. Нами была показана клиническая значимость фармако-молекулярной модели для предсказания прогрессирования РМП у пациентов, получавших химиотерапию с использованием гемцитабина.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Программы фундаментальных исследований Национального исследовательского университета “Высшая школа экономики” (НИУ ВШЭ).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lenis A. T., Lec P. M., and Chamie K., Bladder cancer a review, *JAMA – Journal of the American Medical Association*, vol. 324, no. 19. American Medical Association, pp. 1980–1991, Nov. 17, 2020.
2. Карпин А.Д., Старинский В.В., and Шахзадова А.О., Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году, 2021.
3. Cao Y. et al., Phase I study of gemcitabine-cisplatin versus pemetrexed-cisplatin for patients with advanced or metastatic bladder cancer, *JBUON*, vol. 23, no. 2, pp. 475–481, 2018.
4. Saiki Y., Hirota S., and Horii A., Attempts to remodel the pathways of gemcitabine metabolism: Recent approaches to overcoming tumours with acquired chemoresistance, *Cancer Drug Resistance*, vol. 3, no. 4. OAE Publishing Inc., pp. 819–831, 2020.
5. Wong A., Soo R.A., Yong W.P., and Innocenti F., Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine, *Drug Metabolism Reviews*, vol. 41, no. 2. pp. 77–88, May 2009.
6. Pastor-Anglada M. and Pérez-Torras S., Emerging roles of nucleoside transporters, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, no. JUN. Frontiers Media S.A., Jun. 06, 2018.
7. Spratlin J. et al., The Absence of Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 Is Associated with Reduced Survival in Patients With Gemcitabine-Treated Pancreas Adenocarcinoma. Accessed: Dec. 12, 2022. [Online]. Available.
8. Nishio R. et al., Disrupted plasma membrane localization of equilibrative nucleoside transporter 2 in the chemoresistance of human pancreatic cells to gemcitabine (dFdCMP), *Cancer Sci*, vol. 102, no. 3, pp. 622–629, Mar. 2011.
9. Yang H. et al., Genome-Wide CRISPR Screening Identifies DCK and CCNL1 as Genes That Contribute

- to Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer, *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 13, Jul. 2022.
10. Espinoza J.A. et al., Low expression of equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with poor prognosis in chemotherapy-naïve pT2 gallbladder adenocarcinoma patients, *Histopathology*, vol. 68, no. 5, pp. 722–728, Apr. 2016.
  11. Ioannidis G. et al., Messenger-RNA expression of five gemcitabine sensitivity-related genes predicting outcome in advanced-stage non-small cell lung cancer, *Anticancer Res*, vol. 40, no. 2, pp. 901–913, 2020.
  12. Hoadley K.A. et al., Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer, vol. 173, no. 2, pp. 291–304, 2020.
  13. Garcia-Cremades M., Melillo N., Troconiz I.F., and Magni P., Mechanistic Multiscale Pharmacokinetic Model for the Anticancer Drug 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) in Pancreatic Cancer, *Clin Transl Sci*, vol. 13, no. 3, pp. 608–617, May 2020.
  14. Virtanen P. et al., SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python, *Nat Methods* 17, 261–272 (2020).
  15. Mackey J. R. et al., Gemcitabine Transport in Xenopus Oocytes Expressing Recombinant Plasma Membrane Mammalian Nucleoside Transporters. [Online]. Available.
  16. Garcia-Cremades M. et al., Predicting tumour growth and its impact on survival in gemcitabine-treated patients with advanced pancreatic cancer, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 115.
  17. Derissen E. J. B. et al., Intracellular pharmacokinetics of gemcitabine, its deaminated metabolite 2',2'-difluorodeoxyuridine and their nucleotides, *Br J Clin Pharmacol*, 84: 1279–1289, 2018.

## INTRACELLULAR GEMCITABINE MONOPHOSPHATE LEVELS PREDICT CHEMOTHERAPY EFFICACY IN GEMCITABINE-TREATED PATIENTS WITH BLADDER CANCER

M. R. Yanova<sup>a,#</sup>, A. P. Zhiyanov<sup>a</sup>, I. D. Antipenko<sup>a</sup>, S. A. Slobodov<sup>a</sup>, and E. V. Stepanova<sup>a</sup>

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

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

Presented by Academician of the RAS N.E. Kushlinskiy

Gemcitabine monophosphate (dFdCMP), one of the intracellular forms of phosphorylated gemcitabine, determines its antitumor activity. A pharmacomolecular model for determining gemcitabine relative monophosphate levels has been developed based on the assessment of the activity of ENT1, ENT2 channels and dCK, CDA enzymes in tumor tissue. Gemcitabine relative monophosphate levels is a more relevant predictive factor of gemcitabine resistance of bladder cancer when compared with the expression of individual markers related to dFdCMP formation.

**Keywords:** bladder cancer, gemcitabine, cytotoxicity, mathematical model

УДК 577.218

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МРНК С С-КОНЦЕВЫМ ДОМЕНОМ PCID2, СУБЪЕДИНИЦЕЙ КОМПЛЕКСА TREX-2, НЕОБХОДИМО ДЛЯ ЕЕ ЭКСПОРТА ИЗ ЯДРА В ЦИТОПЛАЗМУ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2023 г. Ю. А. Вдовина<sup>1,\*</sup>, академик РАН С. Г. Георгиева<sup>1</sup>, Д. В. Копытова<sup>1,\*\*</sup>

Поступило 24.07.2023 г.  
После доработки 08.09.2023 г.  
Принято к публикации 08.09.2023 г.

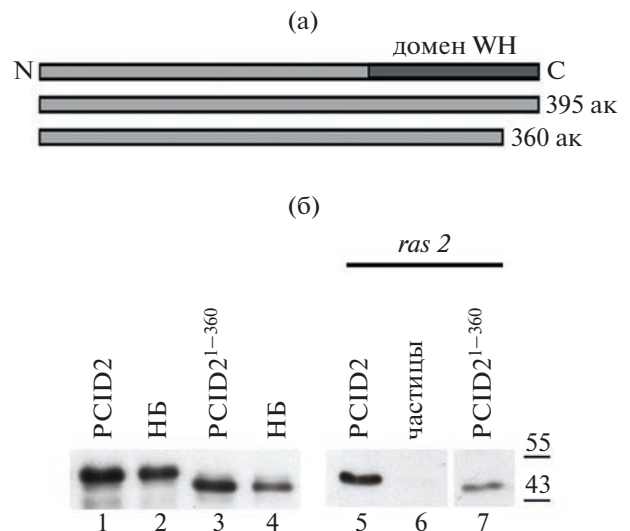
После этапа транскрипции новосинтезированная мРНК экспортируется из ядра в цитоплазму и далее к месту трансляции. Комплекс TREX-2 принимает участие на этапе экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Этот комплекс у *Drosophila melanogaster* состоит из четырех белков: Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. В нашей работе мы показали, что делеция С-концевой последовательности PCID2 приводит к уменьшению взаимодействия белка с РНК и к нарушению экспорта мРНК из ядра в цитоплазму у *D. melanogaster*.

**Ключевые слова:** TREX-2, PCID2, экспорт мРНК, транскрипция

**DOI:** 10.31857/S268673892360053X, **EDN:** GPVOWL

Процесс экспрессии генов состоит из множества этапов, на каждом из которых действуют определенные комплексы белков, регулирующие этот процесс. Комплекс TREX-2, участвующий в экспорте мРНК из ядра, у *D. melanogaster* состоит из четырех белков: Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p [1–3]. Некоторые из субъединиц комплекса участвуют и в других этапах экспрессии генов. Известно, что одна из субъединиц комплекса, белок ENY2 также входит в состав комплекса SAGA и взаимодействует с комплексом ТНО, таким образом, участвуя и в этапе инициации, и в этапе элонгации транскрипции [4–6]. dENY2 также участвует в барьерной активности различных инсуляторов [7, 8]. Белок же PCID2 не только участвует в экспорте мРНК в ядре, но и участвует в транспорте мРНК в цитоплазме [9, 10]. В составе комплекса PCID2 взаимодействует с мРНК в реакциях иммунопреципитации РНК и, возможно, определяет специфичность взаимодействия TREX-2 с мРНК [10]. Несмотря на исследование функций комплекса TREX-2 в течение продолжительного времени, остается не ясным, как комплекс взаимодействует с мРНК [11–17]. При исследованиях на дрожжах было обнаружено, что гомологи Xmas-2 и PCID2 вместе связывают РНК, образуя общую поверхность связывания

[18]. У гомолога PCID2 дрожжей за связывание с РНК отвечает домен, располагающийся на С-конце белка. Были определены аминокислоты,

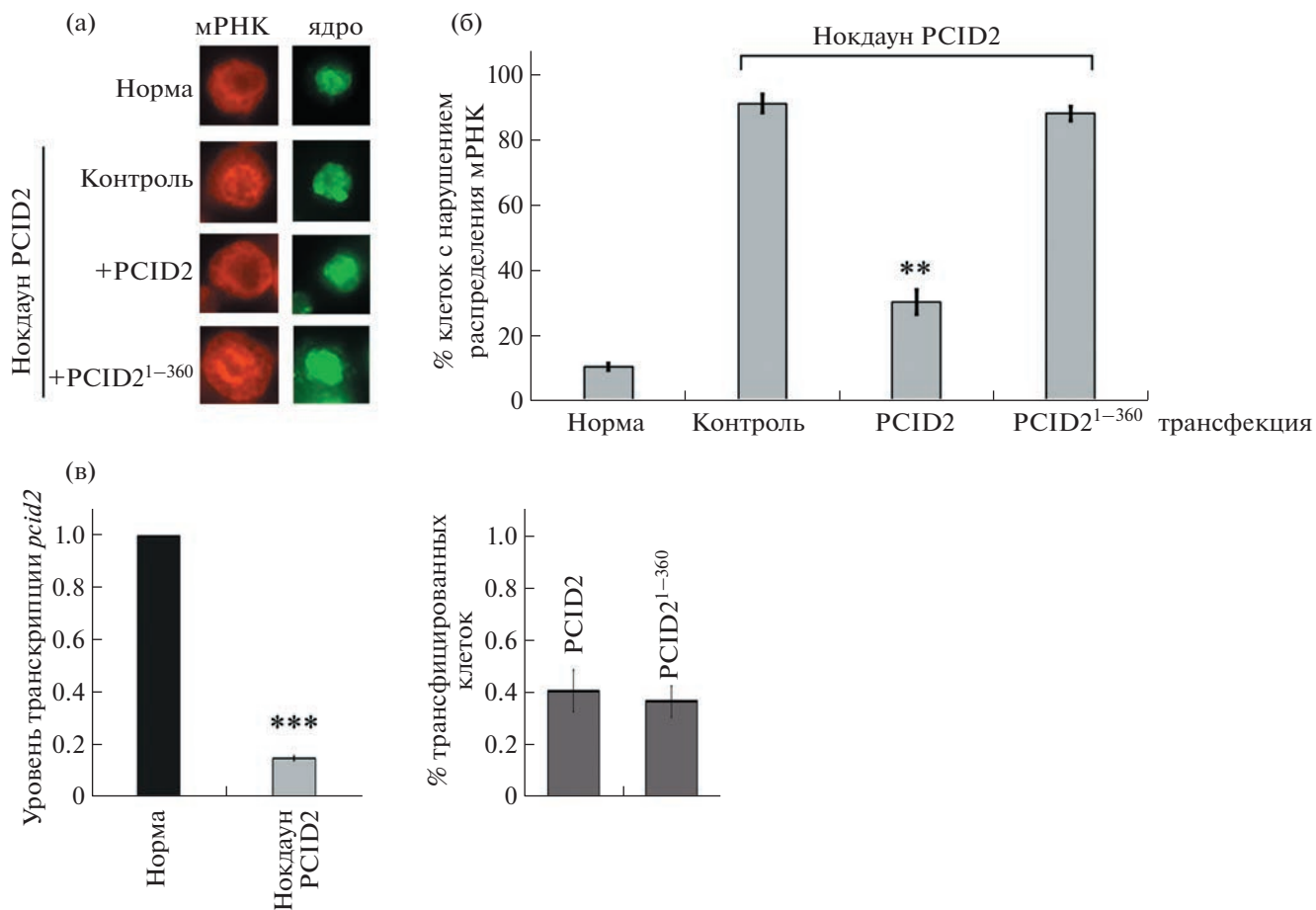


**Рис. 1.** С-концевой домен PCID2 взаимодействует с мРНК *ras2* в экспериментах Pull-down. (а) – доменная структура белка PCID2. На рисунке отмечены взятые в эксперимент полноразмерный белок и PCID2<sup>1–360</sup>, у которого на С-конце удалены 35 аминокислот. (б) – фореграмма Вестерн-блот-анализа связывания белков с биотинилированной мРНК *ras2*. Мембрана была гибридизована с антителами к PCID2 [1]. Дорожки 1, 3 – экспрессированные белки, взятые на связывание; 2, 4 – НБ – фракции белков, не связавшихся с мРНК *ras2*; 5, 7 – фракции, содержащие связавшиеся с мРНК *ras2* белки; 6 – фракция связывания мРНК *ras2* со стрептавидин-агарозой.

<sup>1</sup>Федеральное Государственное Учреждение науки  
Институт молекулярной биологии Российской  
академии наук, Москва, Российская Федерация

\*e-mail: yuvdov2020@gmail.com

\*\*e-mail: d\_dmitrieva@mail.ru



**Рис. 2.** С-концевой домен PCID2 необходим для экспорта мРНК. (а) РНК FISH был выполнен с использованием Су3-меченного oligo-dT-праймера для визуализации полиА РНК, ядра были окрашены DAPI. Клетки были обработаны двуцепочечной РНК, соответствующей PCID2. Клетки с нокдауном PCID2 были использованы в эксперименте в качестве положительного контроля. Распределение мРНК (зеленый сигнал), клеточное ядро (красный сигнал) показаны для необработанных клеток (норма), при нокдауне PCID2 (контроль), при нокдауне и трансфекции клеток с нокдауном PCID2 полноразмерным PCID2 (+PCID2), при нокдауне PCID2 и трансфекции PCID2<sup>1-360</sup> (+PCID2<sup>1-360</sup>) (1000× увеличение). (б) Количественное представление результатов эксперимента на рис. 2а. Столбики показывают процент клеток с нарушенным экспортом мРНК (около 200 клеток было исследовано). (в) – Гистограммы уровня интерференции мРНК *pcid2* и уровня трансфекции интерферированных S2 клеток PCID2 и PCID2<sup>1-360</sup>.

участвующие во взаимодействии [18]. В нашей работе мы исследовали, принимает ли участие в связывании с РНК данный домен у PCID2 *D. melanogaster* и необходим ли этот домен для выполнения основных функций PCID2. Исследования взаимодействия PCID2 с мРНК у *D. melanogaster* проводили, используя метод Pull-down с биотинилированной РНК.

В качестве модельной РНК, с которой было исследовано связывание, была использована мРНК гена *ras2*, меченная биотином. Так как взаимодействие PCID2 в составе комплекса с данной мРНК было показано ранее в реакциях иммунопреципитации РНК [10]. В эксперименте были использованы экспрессированные в бактериальной системе белки: полноразмерный PCID2 и

PCID2<sup>1-360</sup> (PCID2, у которого были удалены 35 аминокислот на С-конце белка). Схема белков представлена на рис. 1а.

Белки связывали с биотинилированной мРНК *ras2*, затем инкубировали со стрептавидин-агарозой и отмывали от несвязавшегося белка раствором, содержащим высокую соль. Связавшийся с мРНК белок был визуализирован при разделении в ПААГ и Вестерн блот гибридизацией с антителами к PCID2 (рис. 1б). Оказалось, что форма PCID2<sup>1-360</sup> связывается с мРНК *ras2* гораздо менее эффективно, чем полноразмерный PCID2. Таким образом, у PCID2 *D. melanogaster* на С-конце белка располагается домен связывания РНК, в тех 35 аминокислотах, которые были удалены. Однако, поскольку связывание белка с РНК *ras2* не ис-



чезало совсем, можно предположить, что у PCID2 есть и другой домен связывания РНК.

Влияние данной делеции на основную функцию PCID2 – экспорт мРНК из ядра в цитоплазму было изучено на S2 клетках *D. melanogaster*. В клетках были проведены нокдаун PCID2 с помощью метода интерференции РНК и трансфекция клеток конструкцией рАС-PCID2<sup>1–360</sup> с НА эпитопом. В качестве контрольных клеток были использованы клетки с нокдауном PCID2 и трансфекцией конструкцией рАС-PCID2 с НА эпитопом (рис. 2а, б).

Анализ уровня нокдауна белка проводился с помощью Вестерн блот гибридизации, процент трансфицированных клеток определялся по количеству клеток при иммуоокрашивании их антителами к НА эпитопу, представлены в виде гистограм (рис. 2в). В нормальных, необработанных клетках мРНК распределяется неравномерно, преимущественно в цитоплазме. Нокадаун PCID2 приводил к задержке в ядре и перераспределению мРНК в 91% случаев. Трансфекция полноразмерным белком на фоне нокдауна приводила к уменьшению количества aberrantных клеток до 27%. В то же время трансфекция белком PCID2<sup>1–360</sup> не приводила к данному эффекту и количество клеток с задержкой и перераспределением мРНК не менялось (88%). Исходя из данного эксперимента можно предположить, что С-концевой домен необходим для выполнения функций PCID2 в ядре.

Таким образом, в нашей работе мы показали, что С-концевой домен PCID2 *D. melanogaster* отвечает за взаимодействие белка с РНК и необходим для эффективного экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Представленные данные также показали, что в отличие от гомолога PCID2 дрожжей, у PCID2 *D. melanogaster* существует(ют) еще домен(ы) связывания РНК.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП ИМБ РАН.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-14-00270.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., et al. ORC interacts with THSC/TREX-2 and its subunits promote Nxf1 association with mRNP and mRNA export in *Drosophila*. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. №10. P. 4920–4933.
2. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., et al. SAGA and a novel *Drosophila* export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC // EMBO Journal. 2007. V. 26, № 24. P. 14956–65.
3. Stewart M. Structure and Function of the TREX-2 Complex. // Sub-cellular biochemistry. United States, 2019. V. 93. P. 461–470.
4. Pascual-Garcia P., Govind C.K., Queralt E., et al. Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. // Genes & development. United States, 2008. V. 22. № 20. P. 2811–2822.
5. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., et al. The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF(II)40 and potentiates transcription activation on chromatin templates. // Molecular and cellular biology. United States, 2001. V. 21. № 15. P. 5223–5231.
6. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., et al. Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. // Genes & development. United States, 2010. V. 24. № 1. P. 86–96.
7. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., et al. Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. // Molecular cell. United States, 2007. V. 27. № 2. P. 332–338.
8. Maksimenko O., Kyrchanova O., Bonchuk A., et al. Highly conserved ENY2/Sus1 protein binds to *Drosophila* CTCF and is required for barrier activity. // Epigenetics. 2014. V. 9. № 9. P. 1261–1270.
9. Farny N.G., Hurt J.A., Silver P.A. Definition of global and transcript-specific mRNA export pathways in metazoans. // Genes & development. United States, 2008. V. 22. № 1. P. 66–78.
10. Glukhova A.A., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N., et al. PCID2, a subunit of the *Drosophila* TREX-2 nuclear export complex, is essential for both mRNA nuclear export and its subsequent cytoplasmic trafficking // RNA Biology. United States, 2021. V. 18, № 11. P. 1969–1980.
11. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. // Nucleic acids research. England, 2012. V. 40. № 10. P. 4562–4573.
12. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. // Molecular cell. United States, 2009. V. 33. № 6. P. 727–737.
13. Jani D., Valkov E., Stewart M. Structural basis for binding the TREX2 complex to nuclear pores, GAL1 localisation and mRNA export. // Nucleic acids research. England, 2014. V. 42. № 10. P. 6686–6697.
14. Fischer T., Strasser K., Racz A., et al. The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. // The EMBO journal. England, 2002. V. 21. № 21. P. 5843–5852.
15. Gonzalez-Aguilera C., Tous C., Gomez-Gonzalez B., et al. The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in

- transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. // *Molecular biology of the cell*. United States, 2008. V. 19. № 10. P. 4310–4318.
16. Lu Q., Tang X., Tian G., et al. Arabidopsis homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. // *The Plant journal: for cell and molecular biology*. England, 2010. V. 61. № 2. P. 259–270.
17. Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.-J., et al. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. // *Cell*. United States, 2004. V. 116. № 1. P. 75–86.
18. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E., et al. Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. // *Nature structural & molecular biology*. United States, 2012. V. 19. № 3. P. 328–336.

## INTERACTION OF MRNA WITH THE C-TERMINAL DOMAIN OF PCID2, A SUBUNIT OF THE TREX-2 COMPLEX, IS REQUIRED FOR ITS EXPORT FROM THE NUCLEUS TO THE CYTOPLASM IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Y. A. Vdovina<sup>a, #</sup>, Academician of the RAS S. G. Georgieva<sup>a</sup>, and D. V. Kopytova<sup>a, ##</sup>

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

<sup>#</sup>*e-mail: yuvdov2020@gmail.com*

<sup>##</sup>*e-mail: d\_dmitrieva@mail.ru*

Following the transcription step, the newly synthesized mRNA is exported from the nucleus to the cytoplasm and further to the translation site. The TREX-2 complex is involved in the step of mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. This complex in *Drosophila melanogaster* consists of four proteins: Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. In our work, we have shown that deletion of the C-terminal sequence of PCID2 leads to a decrease in the interaction of the protein with RNA and to impaired mRNA export from the nucleus to the cytoplasm in *D. melanogaster*.

*Keywords:* TREX-2, PCID2, mRNA export, transcription

УДК 577.218

## РЕМОДЕЛИРУЮЩИЙ ХРОМАТИН КОМПЛЕКС РВАФ УЧАСТВУЕТ В АКТИВАЦИИ И РЕПРЕССИИ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ

© 2023 г. А. В. Феоктистов<sup>1,2,\*</sup>, академик РАН С. Г. Георгиева<sup>1</sup>, Н. В. Сошникова<sup>1,2</sup>

Поступило 10.08.2023 г.  
После доработки 08.09.2023 г.  
Принято к публикации 08.09.2023 г.

Ремоделирующий хроматин комплекс РВАФ является одним из важнейших регуляторов состояния хроматина и транскрипции генов у высших эукариот. В данной работе изучена роль РВАФ в регуляции NF-κB – зависимой и JAK/STAT – зависимой активации генов воспаления. Показано, что разрушение модуля РВАФ, отвечающего за его связывание с хроматином промотора гена, изменяет уровень транскрипции генов обоих путей. Показано, что РВАФ может быть как активатором, так и репрессором генов воспаления. Таким образом, РВАФ является одним из важных регуляторов экспрессии генов воспаления.

**Ключевые слова:** SWI/SNF, эукариотические факторы транскрипции, воспаление, NF-κB, JAK/STAT, экспрессия генов

**DOI:** 10.31857/S2686738923600462, **EDN:** GPQOZU

Для начала транскрипции необходимо взаимодействие транскрипционного аппарата, включающего РНК полимеразу II, основные факторы транскрипции и другие регуляторы с промоторной областью гена. Однако возможность такого связывания зависит от плотности расположения нуклеосом на промоторе, которая регулируется комплексами ремоделинга хроматина. Данные комплексы могут перемещать и убирать нуклеосомы на промоторе, меняя тем самым его структуру с так называемой “закрытой” на “открытую” (высокая и более низкая плотность нуклеосом соответственно).

Комплексы типа SWI/SNF, изменяющие структуру хроматина на промоторе генов, играют одну из важнейших функций в активации транскрипции. SWI/SNF делятся на подсемейства, комплексы BAF и РВАФ, имеющие одинаковую структуру, в которой можно выделить каталитический модуль, включающий АТФазу BRG1, модуль ARP, имеющий структурную функцию, и модуль, отвечающий за взаимодействие комплек-

са с хроматином [1]. Комплекс РВАФ отличается от BAF несколькими субъединицами модуля (специфическими субъединицами), ответственными за связывание с хроматином, что определяет избирательность его взаимодействия с хроматином, имеющим определенную эпигенетическую структуру (рис. 1а). Комплекс РВАФ является важнейшим коактивационным комплексом, реструктурирующим хроматин. У млекопитающих РВАФ вовлечен в активацию большого числа генов, участвуя в контроле таких процессов, как пролиферация, дифференцировка клеток и онкогенез [2].

Ряд данных показывает, что комплексы SWI/SNF играют важную роль в активации генов воспаления. В ряде работ было показано взаимодействие субъединиц комплексов с белками транскрипционных факторов группы NF-κB, играющими центральную роль в индуцибельной экспрессии воспалительных генов. Так, АТФазы Brg1 и Brm взаимодействуют с Rel-A и Rel-B [3]. Rel-B также взаимодействует с несколькими субъединицами, общими для BAF и РВАФ комплексов: BAF170, BAF155 и BAF60. Нокдаун субъединиц комплекса влияет на транскрипцию ряда генов воспаления, таких как Il12b, Ifnb1, Saa3, Ccl5, Nos2, Il6, Il12b [4]. Участие подсемейства BAF в активации генов воспаления было показано в нескольких работах. Так, его специфические субъединицы BAF45B и BAF45C взаимодействуют с p50, а BAF250 участвует в активации транскрипции генов Il6, CXCL1, IL1A, IL1B, IL6

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Центр точного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

\*e-mail a.feo95@mail.ru



**Рис. 1.** (а) Структура РВАФ комплекса. В таблице обозначены субъединицы модуля: общие для всех комплексов типа SWI/SNF и специфические, присутствующие только в РВАФ. Показан модуль, в который они входят, и их функции. (б) Нокдаун специфической субъединицы РВАФ, белка BAF200 (B200), по сравнению с контрольными клетками (Конт) приводит к деградации других субъединиц специфического модуля: BAF180, BRD7 и PHF10, но не общих субъединиц – BAF155 и BAF47 в клетках HEK293. Окраска антителами против тубулина использовалась как контроль нанесения белкового экстракта.

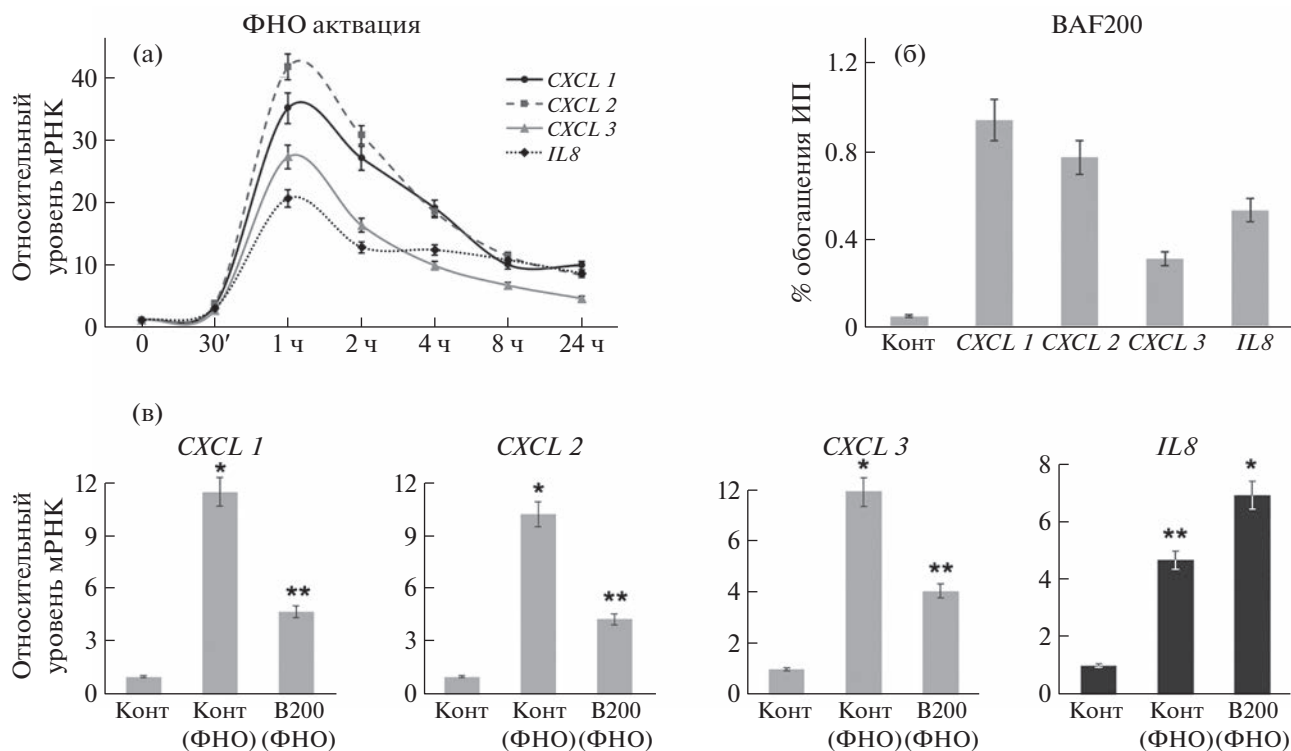
и IL8. Однако роль РВАФ в активации генов воспаления практически не изучена.

В настоящее время показано, что промоторы ряда генов раннего воспалительного ответа имеют более открытую структуру хроматина, чем промоторы поздних генов. Это делает их транскрипцию более независимой от необходимости ремоделирования хроматина (более подробная информация в обзоре [5]). Тем не менее комплекс РВАФ был найден на промоторах ранних провоспалительных генов [6].

Данная работа была направлена на изучение роли РВАФ в регуляции ранних генов воспаления, активирующихся сигнальным каскадом NF-κB и сигнальным путем JAK/STAT. Для работы была выбрана линия клеток HEK293, которая ранее эффективно использовалась другими авторами для изучения регуляции генов воспаления [7]. Была изучена транскрипция генов воспаления в норме и при связывании с их промотором РВАФ, у которого был нарушен РВАФ-специфический модуль, участвующий во взаимодействии с хроматином. Был проведен нокдаун компонента специфического модуля субъединицы *BAF200*. Клетки HEK293 были обработаны смесью трансфецирующего реагента Metafecten (Biontex) и короткими дуплексами РНК против *BAF200* (*BAF200\_for*: 5'-CAAGGGACUUCUGGCAAC-CAGGdTdT, *BAF200\_rev*: 5'-CCUGGUUGC-CAGAAGUCCCUUGdTdT) или контрольными (*Контр\_for*: 5'-AGGUCGAACUACGGGUCAdT-dC, *Контр\_rev*: 5'-UUGACCCGUAGUUCGACCU-dAdG) в течение 48 ч и затем клеточные лизаты про-

анализированы Вестер-блоттингом (рис. 16). Антитела, использованные для детекции субъединиц, были ранее получены в нашей лаборатории и охарактеризованы [8, 9]. Наши эксперименты показали, что нокдаун *BAF200* в клетках человека не влияет на каталитический модуль комплекса РВАФ, но частично нарушает структуру модуля связывания хроматина, что приводит к деградации его компонентов, специфичных для РВАФ: *BAF180*, *BRD7* и *PHF10*. Как показано на рис. 16, их уровень в клетке значительно понижается при нокдауне *BAF200*. В результате этого нарушается взаимодействие РВАФ с хроматином на промоторах регулируемых генов [10].

Активацию транскрипции провоспалительных генов, зависящих от NF-κB сигнального пути, проводили добавлением к клеткам фактора некроза опухолей (ФНО) в количестве 20 нг/мл. Для работы были выбраны гены *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *IL8*, которые хорошо активируются при добавлении ФНО в клетках линии HEK293 (любезно предоставленной проф. И. Ронинсоном) [7]. Пик транскрипции этих генов достигается через один час после начала активации (рис. 2а). Поэтому все дальнейшие измерения проводили до активации транскрипции и через час после. Также с помощью иммунопреципитации хроматина мы показали локализацию *BAF200* на промоторах данных генов без активации (рис. 2б). В основе этого эксперимента лежит осаждение изучаемого белка, взаимодействующего с хроматином, и предварительно сшитым с ним с помощью формальдегида, специфическими антителами.



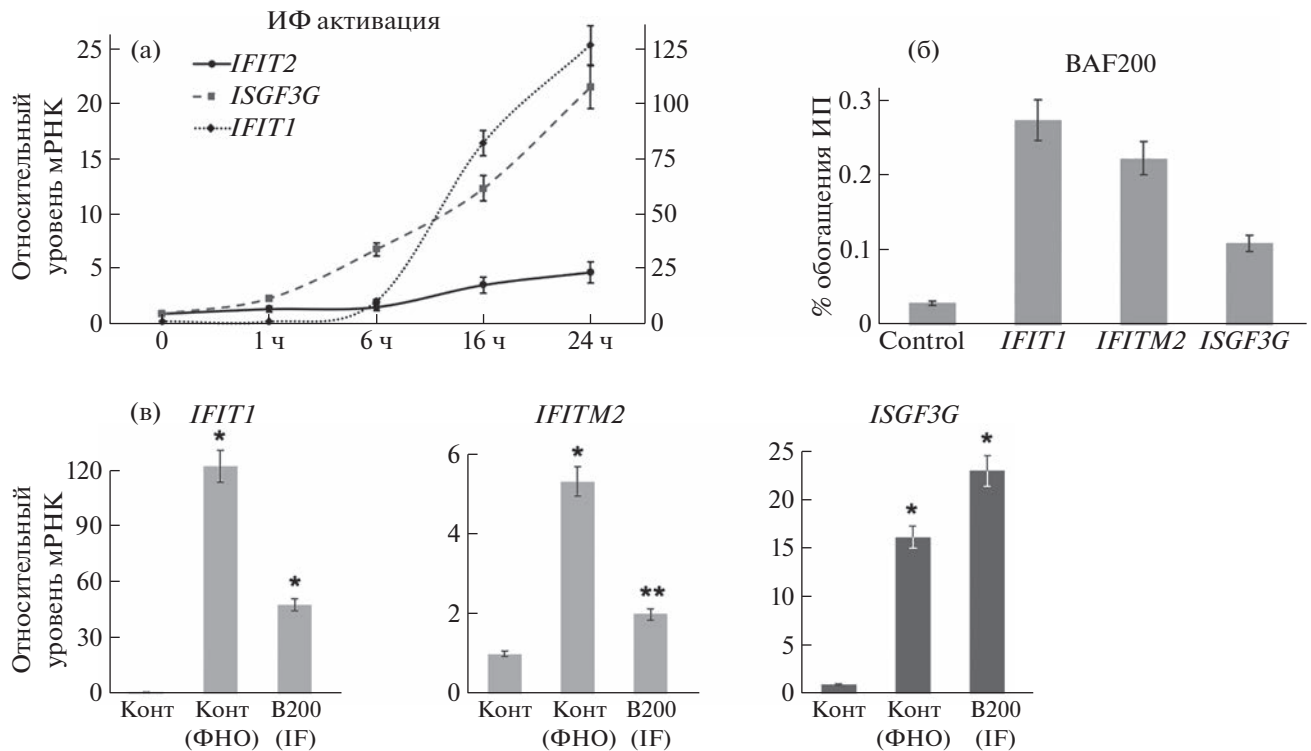
**Рис. 2.** (а) Активация генов воспаления *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* и *IL8* в процессе активации NF-κB сигнального пути с помощью ФНО в течение 24 часов. (б) Показана локализация субъединицы BAF200 на промоторах изучаемых генов с помощью хроматин-иммунопреципитации. По оси у показаны проценты обогащения относительно вносимого материала (% обогащения ИП). Измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. (в) Уровень экспрессии генов *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* и *IL8* без активации (Конт), при активации в течение одного часа (Конт (ФНО)) и при активации при нокдауне BAF200 (B200 (ФНО)) также в течение одного часа. По оси у показано изменение уровня РНК относительно контроля при нормировании на уровень экспрессии гена *RPLP0*. Во всех экспериментах измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. \* –  $p < 0.001$ , \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета).

ми. После осаждения, элюции и восстановления формальдегидных сшивок белки деградируют с помощью протеиназы К, а фрагменты ДНК выделяют и используют в качестве матрицы для количественной ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами к определенному участку генома. Уровень транскрипции генов до активации, после активации ФНО и после активации на фоне нокдауна *BAF200* также измеряли методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Экспрессию анализируемых генов нормировал на экспрессию гена *RPLP0*. Уровень транскрипции генов повышался примерно на порядок или больше после активации транскрипции. Нокдаун *BAF200* приводил к значительному падению уровня мРНК генов *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, что показывает, что РВАФ является их коактиватором (рис. 2в). Уровень мРНК *IL8*, наоборот, понижался при нокдауне.

Аналогичные эксперименты были проведены на генах JAK/STAT зависимого пути *IFIT1*, *IFITM2*, *ISGF3G*. Активацию проводили добавлени-

ем к клеткам НЕК293 интерферона-А (ИФ) (1000 U/мл). В данном случае измерения проводили через 20 ч после начала активации, так как согласно нашим данным именно в это время достигается пик транскрипции изучаемых нами генов (рис. 3а). На промоторах этих генов BAF200 также локализуется в норме (рис. 3б). Наши результаты показали, что, в то время как все гены эффективно активировались добавлением ИФ, уровень мРНК генов *IFIT1*, *IFITM2* падал от нокдауна BAF200 примерно в два раза. Однако транскрипция гена *ISGF3G* выросла примерно в 1.5 раза (рис. 3в).

Таким образом, наши результаты показывают, что РВАФ в зависимости от гена, на котором он присутствует, способен как стимулировать, так и подавлять его активацию. Можно предположить, что различное влияние РВАФ на транскрипцию обусловлено различной структурой хроматина промоторов ранних генов. На промоторе с более плотной организацией нуклеосом транскрипция не будет активироваться в отсутствие ремодели-



**Рис. 3.** (а) Активация генов воспаления *IFIT1*, *IFITM2* и *ISGF3G* в процессе активации JAK/STAT сигнального пути с помощью ИФ в течение 24 ч. По оси У справа показан относительный уровень активации генов *IFITM2* и *ISGF3G*, по оси слева – уровень активации для гена *IFIT1*. (б) Показана локализация субъединицы BAF200 на промоторах изучаемых генов с помощью хроматин-иммунопреципитации. По оси у показаны проценты обогащения относительно вносимого материала (% обогащения ИП). Измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение. (в) Уровень экспрессии генов *IFIT1*, *IFITM2* и *ISGF3G* без активации (Конт), при активации в течение двадцати четырех часов (Конт (ИФ)) и при активации при нокдауне *BAF200* (B200 (ИФ)) также в течение двадцати четырех часов. По оси у показано изменение уровня РНК относительно контроля при нормировании на уровень экспрессии гена *RPLP0*. Во всех экспериментах измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \* –  $p < 0.001$ , \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета).

рования хроматина и нарушение взаимодействия комплекса с хроматином промотора приведет к значительному понижению транскрипции [11]. Наоборот, на открытых промоторах ремоделирование хроматина не является необходимым условием для начала транскрипции. В этом случае присутствие комплекса на промоторе может мешать связыванию других активаторов транскрипции, а его уход приводит к повышению транскрипционного уровня гена. То есть в данном случае РВАФ не позволяет генам активироваться неограниченно и важен для поддержания транскрипции на уровне, необходимом для координированной экспрессии генов воспаления.

Также можно предположить, что РВАФ ограничивает транскрипцию ряда генов воспаления за счет привлечения других регуляторных факторов. Так было показано, что в местах двойных разрывов ДНК субъединицы РВАФ, белки BRD7 и BAF180 фосфорилируются и привлекают в дан-

ный локус ингибиторы транскрипции, репрессивные комплексы Polycomb, PRC1 и PRC2 [12].

Для некоторых генов раннего воспалительного ответа было показано, что их промоторы имеют открытую структуру хроматина и нокдаун АТФаз Brg1 и Brgm не имеет значительного влияния на уровень их транскрипции [6]. Если структура промоторов исследованных нами генов также является открытой, можно предположить, что РВАФ на их промоторах имеет функции, отличные от ремоделинга хроматина. Действительно, как было показано ранее, только часть субъединиц РВАФ необходимо для ремоделинга *in vitro* [14]. Функции большинства субъединиц комплекса в регуляции транскрипции *in vivo* остаются неизвестными.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 21-14-00258).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan J. *et al.*, Structure of human chromatin-remodeling PBAF complex bound to a nucleosome, // *Nature*, 2022. V. 605. P. 166–171.
2. Centore R.C. *et al.*, Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes: Emerging Mechanisms and Therapeutic Strategies, // *Trends in Genetics*, 2020. V. 36. № 12. P. 936–950.
3. Ishizaka A. *et al.*, Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- $\kappa$ B RelA/p50 heterodimer, // *Journal of Biological Chemistry*, 2012. V. 287. № 15. P. 11924–11933.
4. Ramirez-Carrozzi V.R. *et al.*, A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling // *Cell*, 2009. V. 138. № 1. P. 114–128.
5. Gioacchino Natoli, NF- $\kappa$ B and chromatin: ten years on the path from basic mechanisms to candidate drugs // *Immunological Reviews*, 2012. V. 246. № 1. P. 183–192.
6. Ramirez-Carrozzi V.R. *et al.*, Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2 $\beta$  nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response // *Genes & Development*, 2006. V. 20. P. 282–296.
7. Chen M. *et al.*, CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by Nf $\kappa$ B // *PNAS*, 2017. V. 114. № 38. P. 10208–10213.
8. Tatarskiy V.V. *et al.*, Stability of the PHF10 subunit of PBAF signature module is regulated by phosphorylation: role of  $\beta$ -TrCP // *Scientific Reports*, 2017. V. 7. P. 5645.
9. Brechalov A.V. *et al.*, Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit // *Cell Cycle*, 2014. V. 13. № 12. P. 1970–1979.
10. Soshnikova N.V. *et al.*, PHF10 subunit of PBAF complex mediates transcriptional activation by MYC // *Oncogene*, 2021. V. 40. № 42. P. 6071–6080.
11. Vorobyeva N.E. *et al.*, Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex // *PNAS*, 2009. V. 106. № 27. P. 11049–11054.
12. Min S. *et al.*, Transcriptional regulation and chromatin dynamics at DNA double-strand breaks // *Experimental & Molecular Medicine*, 2022. V. 54. P. 1705–1712.
13. Musladin S. *et al.*, The RSC chromatin remodeling complex has a crucial role in the complete remodeler set for yeast PHO5 promoter opening // *Nucleic Acids Research*, 2014. V. 42. № 7. P. 4270–4282.

## CHROMATIN REMODELING COMPLEX PBAF ACTIVATES AND REPRESSES INFLAMMATORY GENES

A. V. Feoktistov<sup>a,b,#</sup>, Academician of the RAS S. G. Georgieva<sup>a</sup>, and N. V. Soshnikova<sup>a,b</sup>

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

<sup>b</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail a.feo95@mail.ru

The PBAF chromatin remodeling complex regulates chromatin state and gene transcription in higher eukaryotes. In this work, we studied the role of PBAF in the regulation of NF- $\kappa$ B- and JAK/STAT-dependent activation of inflammatory genes. We performed knockdown of specific module subunit BAF200 resulted in destruction of the entire PBAF specific module and changed the level of the genes transcription of both pathways. PBAF can be both an activator and a repressor of inflammatory genes. Thus, PBAF is one of the important regulators of inflammatory gene expression.

**Keywords:** SWI/SNF, eukaryotic transcription factors, inflammation, NF- $\kappa$ B, Jak/STAT, gene expression

УДК 577.2

## БЕЛКИ СВР И RAD21 СВЯЗЫВАЮТСЯ НА ГРАНИЦАХ ФОРУМ-ДОМЕНОВ В ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Н. А. Чуриков<sup>1,\*</sup>, И. Р. Алембеков<sup>1</sup>, Е. С. Клушевская<sup>1</sup>, П. Б. Мейлах<sup>1</sup>, А. Н. Кретова<sup>1</sup>,  
О. Д. Манагарова<sup>1</sup>, Г. И. Кравацкая<sup>1</sup>, Ю. В. Кравацкий<sup>1</sup>

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым

Поступило 29.08.2023 г.

После доработки 05.09.2023 г.

Принято к публикации 05.09.2023 г.

Форум-домены – это фрагменты ДНК длиной около 100 kb, ограниченные горячими точками двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР). Они содержат координированно экспрессирующиеся гены. Механизмы, обеспечивающие такую экспрессию, неизвестны. Предполагается, что на границах форум-доменов могут специфически связываться белки, вовлеченные в эпигенетическую регуляцию генов, расположенных в доменах. В настоящей работе мы использовали данные о локализации горячих точек ДЦР и местах связывания десяти ядерных белков в клетках НЕК293Т для того, чтобы выяснить – есть ли среди них белки, которые связываются именно на границах доменов. Оказалось, что два белка – СВР и RAD24, вовлеченные в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов и образование 3D структур хромосом, связываются на границах форум-доменов. Мы предполагаем, что эти белки могут обеспечивать координированную экспрессию генов в доменах.

**Ключевые слова:** форум-домены, двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), эпигенетика, СВР, RAD21

**DOI:** 10.31857/S2686738923600619, **EDN:** XZIWQN

Форум-домены – это области хромосом эукариот длиной около 100 kb, расположенные между горячими точками двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) в хромосомах эукариот [1–3]. Эти домены содержат координированно экспрессирующиеся гены [3]. Природа такой экспрессии пока не понятна. Однако известно, что на границах этих доменов связываются белки PARP1 и HNRNP2B1 [3]. Известно, что PARP1, наряду с участием в репарации ДНК, является регулятором структур хромосом и транскрипции, а HNRNP2B1 участвует в сплайсинге пре-мРНК и может функционировать вместе PARP1 [3]. Двухцепочечные разрывы ДНК являются наиболее частыми и опасными для клетки повреждениями хромосом эукариот [4]. Эти разрывы с неизбежностью появляются *in vivo* как при эндогенных физиологических процессах (транскрипция, репликация, транспозиция, рекомбинация), так и в результате ряда экзогенных химических или физических воздействий [5–7]. Стабильность генома обеспечивают мощные механизмы репарации ДНК, которые полностью заживают все разрывы, иначе бы

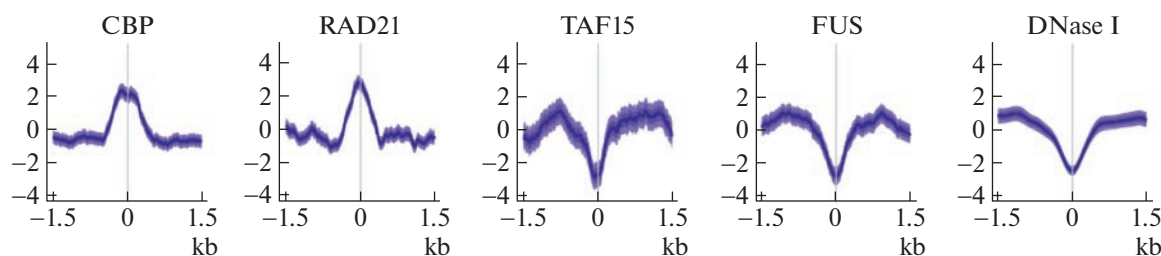
происходила гибель клетки [8]. Обнаружено, что двухцепочечные разрывы ДНК чаще всего происходят в активно работающих генах, контролирующей дифференцировку, развитие и морфогенез [3]. Предполагается, что это связано с активной транскрипцией, при которой образуются так называемые Р-петли (R-loops), области расплетенной ДНК, в которых синтезируется РНК.

Для того, чтобы выяснить, какие еще белки связываются с концевыми областями форум-доменов, и как это может быть связано с координированной экспрессией генов, мы использовали полногеномные данные картирования горячих точек ДЦР и доступные данные ChIP-Seq для десяти белков в линии клеток НЕК293Т. В результате впервые обнаружено, что места горячих точек ДЦР, которые ограничивают эти домены, значительно обогащены местами связывания ко-активатора транскрипции СВР и белка RAD21, вовлеченного в репарацию ДНК. Эти данные могут объяснить координированную экспрессию генов в доменах, а также свидетельствуют об активной репарации ДНК в областях горячих точек ДЦР.

Полногеномные данные о сайтах ДЦР в клетках НЕК293Т с точностью до 1 bp были взяты из ранее полученной нами базы данных GSE201829. Чтения двух реплик из базы данных выравнивали на секвенированный геном человека (версия

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии  
имени В. А. Энгельгардта РАН  
Российской академии наук, Москва, Россия  
\*e-mail: tchurikov@eimb.ru





**Рис. 1.** Профили связывания белков и сайтов DNase I на границах форум-доменов в линии клеток HEK293T. По оси X указаны расстояния от центра горячих точек ДЦР ( $\pm 1.5$  kb). По оси Y указаны значения z-критерия ( $\pm 4$ ). Размытость на кривых указывает на разбросы данных при полногеномном анализе.

GRCh37/hg19 p.13). Соответствие данных картирования ДЦР в репликах было достаточно высоким (Pearson = 0.88, Spearman = 0.93). Для анализа были выбраны наиболее частые разрывы в ДНК (горячие точки ДЦР), которые ограничивают домены ДНК длиной 100 kb и более.

Результаты экспериментов ChIP-Seq для белков CBP, RAD21, TAF15, FUS, ELK4, HDGF, TRIM28, FOXM1, TCF7L2, LEF1 и для сайтов, доступных для DNase I, взяты из базы данных ENCODE (accession numbers: GSM1239075, GSM1081542, GSM1895987, GSM1895985, ENCF658HSX, ENCF347GJE, ENCF340FXG, ENCF784PBW, ENCF851WEQ, ENCF112HIM и ENCF716SFD соответственно).

Профили связывания указанных белков и сайтов DNase I вокруг горячих точек ДЦР ( $\pm 1.5$  kb) получили интерактивно с помощью программы SeqPlots [9]. При этом использовали 10-bp шаг профилирования и нормализацию по z-критерию.

На рис. 1 представлены полногеномные профили мест связывания некоторых белков и сайтов DNase I на границах форум-доменов.

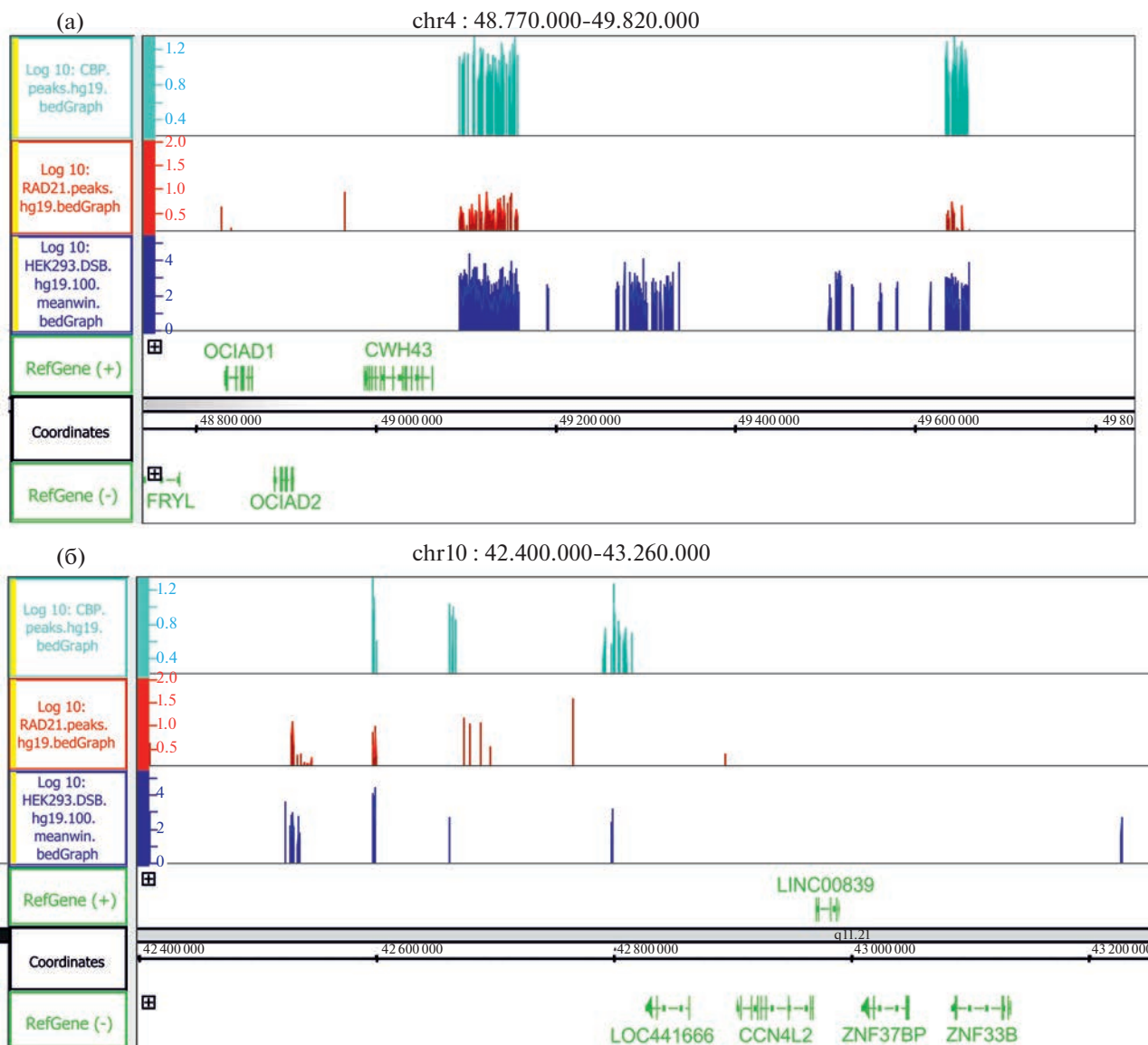
Оказалось, что CBP связывается с горячими точками ДЦР. Ранее было обнаружено, что конкретные сайты разрывов в горячих точках рассеяны во фрагментах ДНК длиной 20–100 bp. Узкий пик профиля связывания CBP указывает на примерное соответствие размерам горячих точек ДЦР. Этот белок постоянно экспрессируется и является ацетилтрансферазой, которая ацетирует гистон H3 по лизину 27 (H3K27ac) на энхансерах и промоторах [10]. Похожий профиль связывания обнаружил и белок RAD21. Он входит в кохезиновый комплекс наряду с белками SMC1a, SMC3, SCC3 и STAG2 [11]. Комплекс вовлечен в репарацию ДЦР, а также выполняет ряд других функций в ядре. Связывание RAD21 было ожидаемым, поскольку горячие точки ДЦР должны репарироваться. Ранее было обнаружено связывание белков UBF, CTCF, TCF7L2, KAP1, PARP1 и H2AX в девяти горячих точках ДЦР в генах рРНК (Пляды), которые являются самыми хрупкими сайтами в хромосомах человека [6]. Последние три белка также ассоциированы с репарацией ДЦР.

Мы не обнаружили связывание двух других анализируемых белков – TAF15 и FUS – на границах форум-доменов (рис. 1). TAF15 (TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15) входит в общий фактор транскрипции TFIID [12], а FUS участвует в сплайсинге пре-мРНК и экспорте зрелых мРНК в цитоплазму [13]. Профили этих белков служат отрицательными контролями в данной работе. Другие белки (ELK4, HDGF, TRIM28, FOXM1, TCF7L2, LEF1) также не обнаружили связывания на границах доменов (не показано). Они были выбраны, поскольку все они являются факторами транскрипции и, как мы предполагали, могут участвовать в регуляции экспрессии в форум-доменах, связываясь на их границах.

Ранее было описано, что горячие точки ДЦР образуются *in vivo* с помощью эндогенных ферментов, тогда как DNase I чувствительные сайты выявляются *in vitro* с помощью экзогенной DNазы [3]. Этот вывод независимо подтверждается профилем сайтов, чувствительных к DNазе, указанном на рис. 1. Природа горячих точек ДЦР иная, эти точки, как видно, не доступны экзогенному ферменту и, следовательно, расположены в закрытом хроматине.

Данные о профилях не отражают возможной сложности распределения мест связывания CBP, RAD21 и их взаимоотношений с горячими точками ДЦР в хромосомах. Для выяснения этих взаимоотношений мы изучили характер их распределения вдоль хромосом, используя геномный браузер. На рис. 2 приведены две области генома. Одна – 1-Мб область хромосомы 4, другая – 800-kb фрагмент chr10. Видно, что почти всегда пикам ДЦР соответствуют области связывания CBP и RAD21. Иногда на один пик ДЦР приходится целая область мест связывания CBP (область 42.8 Mb во фрагменте chr10). Ранее было показано, что менее частые ДЦР находятся и внутри больших доменов [3]. В целом распределение разрывов в ДНК и мест связывания этих двух белков соответствует данным профилирования (рис. 1).

Почему нет однозначного соответствия между местами разрывов в ДНК и сайтами связывания



**Рис. 2.** Характер перекрытия областей связывания СВР, RAD21 и горячих точек ДЦР в линии клеток HEK293Т человека. (а) область хромосомы 4. (б) область хромосомы 10. Координаты указаны для версии генома человека hg19. Области связывания СВР показаны бирюзовым, RAD21 – красным, а горячие точки ДЦР – синим цветом.

RAD21? Мы предполагаем, что это связано с тем, что данный белок вовлечен не только в репарацию ДНК. Известно, что в составе кохезинового комплекса RAD21 играет важную роль в формировании петель хроматина и в организации 3D структур хромосом [14]. Мы предполагаем, что места связывания RAD21 вне горячих точек ДЦР (рис. 2) указывают на области, в которых кохезиновый комплекс образует петли хроматина внутри форум-доменов.

Наши данные указывают на то, что белки СВР и RAD21, выполняя разные функции, вместе участвуют в организации координированной экспрессии в форум-доменах. В процессе формиро-

вания петель хроматина СВР может вносить активную метку хроматина H3K27ac. Это может обеспечивать координированную активацию экспрессии в форум-доменах. Ранее было выяснено, что около 80% форум-доменов подвергается сайленсингу во всех хромосомах человека [3]. Возможно, что и координированный сайленсинг генов в форум-доменах может проходить сходным образом. Только неактивные метки в гистоны может вносить другой фермент(ы), например, метку H3K27me3, входящие в комплекс PCR2. Это предположение подкрепляется тем, что данная эпигенетическая метка связана с репарацией ДЦР в ДНК с помощью гомологичной рекомби-

нации [15]. В настоящее время мы проверяем эти предположения экспериментально.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-01118).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tchurikov N.A., Kretova O.V., Sosin D.V., Zykov I.A., Zhimulev I.F., Kravatsky Y.V. // Genome-wide profiling of forum domains in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 3667–3685.
2. Tchurikov N., Krasnov A.N., Ponomarenko N.A., Golova Y.B., Chernov B.K. // Forum domain in *Drosophila melanogaster* cut locus possesses looped domains inside. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 3221–3227.
3. Tchurikov N.A., Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Grachev S.A., Serebraykova M.V., Romanenko S.A., Vorobieva N.V., Kravatsky Y.V. // DNA Double-Strand Breaks Coupled with PARP1 and HNRNPA2B1 Binding Sites Flank Coordinately Expressed Domains in Human Chromosomes. *PLoS Genet.* 2013. V. 9. P. e1003429.
4. Dudás A., Chovanec M. // DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res.* 2004. V. 566 (2), 131–167.
5. Vilenchik M.M., Knudson A.G. // Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, V. 103. P. 17874–17879.
6. Tchurikov N.A., Yudkin D.V., Gorbacheva M.A., Kulemzina A.I., Grischenko I.V., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Kravatsky Y.V., Kretova, O.V. // Hot spots of DNA double-strand breaks in human rDNA units are produced in vivo. *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 25866.
7. Rinaldi C., Pizzul P., Longhese M.P., Bonetti D. // Sensing R-Loop-Associated DNA Damage to Safeguard Genome Stability. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 8. P. 618157.
8. Roos W.P., Kaina B. // DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006. V. 12. № 9. P. 440–50.
9. Stempor P., Ahringer J. // SeqPlots—Interactive software for exploratory data analyses, pattern discovery and visualization in genomics. *Wellcome Open Res.* 2016. V. 1. P. 14.
10. Martire S., Nguyen J., Sundaresan A. et al. // Differential contribution of p300 and CBP to regulatory element acetylation in mESCs. *BMC Mol and Cell Biol.* 2020. V. 21. P. 55.
11. Cheng H., Zhang N., Pati D. // Cohesin subunit RAD21: From biology to disease. *Gene.* 2020. V. 758, 2020. P. 44966.
12. Hoffmann A., Roeder R.G. // Cloning and characterization of human TAF20/15. Multiple interactions suggest a central role in TFIID complex formation. *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271 (30). P. 18194–18202.
13. Yu Y., Reed R. // FUS functions in coupling transcription to splicing by mediating an interaction between RNAP II and U1 snRNP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. V. 112 (28). P. 8608–8613.
14. Sun Y., Xu X., Zhao W., Zhang Y., Chen K., Li Y., Wang X., Zhang M., Xue B., Yu W., Hou Y., Wang C., Xie W., Li C., Kong D., Wang S., Sun Y. // RAD21 is the core subunit of the cohesion complex involved in directing genome organization. *Genome Biol.* 2023. V. 24 (1). P. 155.
15. Wei S., Li C., Yin Z., Wen J., Meng H., Xue L., Wang J. // Histone methylation in DNA repair and clinical practice: new findings during the past 5-years”. *J Cancer.* 2018. V. 9 (12). P. 2072–2081.

## CBP AND RAD21 BIND AT THE TERMINI OF FORUM DOMAINS IN HUMAN CHROMOSOMES

N. A. Tchurikov<sup>a, #</sup>, I. R. Alembekov<sup>a</sup>, E. S. Klushevskaya<sup>a</sup>, P. B. Meilakh<sup>a</sup>, A. N. Kretova<sup>a</sup>, O. D. Managrova<sup>a</sup>, G. I. Kravatskaya<sup>a</sup>, and Y. V. Kravatsky<sup>a</sup>

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

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

Presented by Academician of the RAS G.P. Georgiev

Forum-domains are 50–100-kb stretches of DNA delimited by the hot spot of DSBs. These domains possess coordinately expressed genes. However, molecular mechanisms of such regulation are not clear. It is supposed that the proteins specifically binding at the termini of domains could be involved in coordinated regulation of expression. In this study we used the results of precise mapping of hot spots of DSBs and ChIP-Seq data for ten nuclear proteins in HEK293T cell line for a search of proteins specifically binding at forum-domains termini. We detected that two proteins – CBP and RAD24-, which are known to be involved in epigenetic regulation of gene expression and formation of 3D chromosomal structures, bind at the termini. We suppose that these proteins could be involved in coordinated expression of genes in forum-domains.

**Keywords:** forum-domains, DSBs, epigenetics, CBP, RAD21

УДК 577.115.3;577.359

## РОЛЬ ОБЫКНОВЕННОГО УЖА *NATRIX NATRIX* (REPTILIA, COLUBRIDAE) В ПЕРЕНОСЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ИЗ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ НА СУШУ

© 2023 г. Академик РАН Ю. Ю. Дгебуадзе<sup>1,2</sup>, Л. А. Неймарк<sup>1</sup>, И. В. Башинский<sup>1,\*</sup>, член-корреспондент РАН Н. Н. Сушиц<sup>3,4</sup>, А. Е. Рудченко<sup>3,4</sup>, член-корреспондент РАН М. И. Гладышев<sup>3,4</sup>

Поступило 20.08.2023 г.

После доработки 08.09.2023 г.

Принято к публикации 10.09.2023 г.

В результате исследований состава жирных кислот (ЖК) у обыкновенного ужа *Natrix natrix* и объектов его питания, головастиков и сеголетков двух видов амфибий: остромордой лягушки *Rana arvalis* и чесночницы Палласа *Pelobates vespertinus*, впервые показано, что высокое суммарное содержание эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК) кислот в биомассе ужей свидетельствует о их важной роли в переносе этих незаменимых веществ из водных экосистем на сушу. Установлено, что поскольку пищевые источники ДГК в наземных экосистемах отсутствуют, ее высокий уровень у сеголетков *R. arvalis* и ужей может обеспечиваться только за счет синтеза из биохимических предшественников, содержащихся в пище водного происхождения.

**Ключевые слова:** эйкозапентаеновая кислота (эпк), докозагексаеновая кислота (дгк), амфибии, рептилии, поток органического вещества

**DOI:** 10.31857/S2686738923700440, **EDN:** XPXETN

Состав полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) некоторых позвоночных животных практически полностью зависит от потребленной пищи из водоемов, поскольку эти вещества синтезируются главным образом водными микроорганизмами. В связи с этим ПНЖК часто используются как биомаркеры при оценках переноса биомассы из водных экосистем в наземные [1]. В основном этот перенос осуществляется при поедании водных организмов наземными, либо при смене среды обитания у амфибиотических животных с водными личинками – амфибий и насекомых. Роль пресмыкающихся в переносе веществ на настоящий момент остается недостаточно изученной. На территории России наиболее перспективным видом пресмыкающихся для исследований в этой области является обыкновенный уж (*Natrix natrix*

(Linnaeus, 1758)). Эта змея питается преимущественно водными организмами, при этом сама входит в рацион многих наземных животных, и может способствовать выносу биомассы из водных экосистем в наземные.

Например, в Поволжье обыкновенный уж отмечен в рационе 54 видов позвоночных, преимущественно птиц (например, аистообразные, соколообразные), и млекопитающих (например, насекомоядные, хищные) [2]. В рационе же самого ужа преобладают амфибии. Например, в Волжском бассейне они составляют по данным различных исследований от 70.8% [3] до 92.8% [4] рациона. Случаи поедания ужами млекопитающих, пресмыкающихся и птиц отмечены во многих исследованиях (например, [5, 6]), но в сумме по биомассе составляют не более 2% рациона [7]. Взрослые ужи чаще поедают прошедших метаморфоз лягушек, чем головастиков. Максимальная доля головастиков в питании ужа (33.3%) была отмечена Клёниной [3]. Обычно в рационе ужей преобладают озерная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), остромордая лягушка *Rana arvalis* Nilsson, 1842 и травяная лягушка *Rana temporaria* Linnaeus, 1758. В Пензенской области в питании ужа преобладала остромордая лягушка (61%) и озерная лягушка (20%) [8]. Можно предположить, что уж не проявляет существенной избирательности при выборе между разными вида-

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

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

<sup>3</sup>Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск, Россия

<sup>4</sup>Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

\*e-mail: ivbash@mail.ru



**Таблица 1.** Среднее содержание количественно значимых жирных кислот (% от суммы ЖК ± стандартная ошибка) и их суммы (мг/г сырой массы) в биомассе головастика и сеголетков *P. vespertinus* и *R. arvalis* и ужей *N. natrix*

ЖК	<i>R. arvalis</i> головастики	<i>P. vespertinus</i> головастики	<i>R. arvalis</i> сеголетки	<i>P. vespertinus</i> сеголетки	<i>N. natrix</i>
12:0*	1.1 ± 0.13 <sup>A</sup>	0.1 ± 0.00 <sup>AB</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>BC</sup>	0.1 ± 0.00 <sup>B</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>C</sup>
14:0*	1.7 ± 0.26 <sup>A</sup>	0.8 ± 0.06 <sup>AB</sup>	0.8 ± 0.07 <sup>BC</sup>	1.3 ± 0.18 <sup>AC</sup>	0.3 ± 0.03 <sup>B</sup>
15:0	0.8 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.8 ± 0.06 <sup>A</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>B</sup>	1.1 ± 0.05 <sup>C</sup>	0.3 ± 0.03 <sup>B</sup>
16:0	22.2 ± 0.60 <sup>A</sup>	22.1 ± 0.52 <sup>A</sup>	20.6 ± 0.41 <sup>AB</sup>	19.9 ± 0.44 <sup>B</sup>	15.9 ± 0.53 <sup>C</sup>
16:1n-9	0.7 ± 0.11 <sup>AB</sup>	0.7 ± 0.06 <sup>AB</sup>	0.8 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.5 ± 0.05 <sup>BC</sup>	0.3 ± 0.07 <sup>C</sup>
16:1n-7	5.8 ± 0.36 <sup>A</sup>	5.3 ± 0.33 <sup>AC</sup>	1.8 ± 0.21 <sup>B</sup>	4.7 ± 0.22 <sup>C</sup>	1.8 ± 0.26 <sup>B</sup>
15-17BFA	2.5 ± 0.08 <sup>A</sup>	1.0 ± 0.07 <sup>BD</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>C</sup>	1.2 ± 0.08 <sup>B</sup>	0.8 ± 0.11 <sup>D</sup>
Σ16PUFA	0.2 ± 0.04 <sup>AC</sup>	0.2 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.3 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>BC</sup>
17:0	1.4 ± 0.03 <sup>A</sup>	1.2 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.7 ± 0.03 <sup>C</sup>	1.5 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.7 ± 0.06 <sup>C</sup>
Σ17:1	0.6 ± 0.06 <sup>AB</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>BC</sup>	0.3 ± 0.02 <sup>C</sup>	0.7 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.4 ± 0.04 <sup>C</sup>
18:0	10.4 ± 0.28 <sup>A</sup>	9.6 ± 0.53 <sup>AB</sup>	9.4 ± 0.40 <sup>AB</sup>	8.1 ± 0.46 <sup>B</sup>	10.1 ± 0.24 <sup>A</sup>
18:1n-9	12.7 ± 2.34 <sup>AB</sup>	8.4 ± 0.55 <sup>B</sup>	16.8 ± 0.92 <sup>A</sup>	9.4 ± 0.62 <sup>B</sup>	22.5 ± 1.73 <sup>C</sup>
18:1n-7	6.8 ± 0.33 <sup>A</sup>	5.5 ± 0.25 <sup>B</sup>	3.4 ± 0.08 <sup>C</sup>	5.3 ± 0.19 <sup>B</sup>	6.3 ± 0.51 <sup>AB</sup>
18:2n-6	5.1 ± 0.30 <sup>A</sup>	6.8 ± 0.32 <sup>A</sup>	14.4 ± 0.55 <sup>B</sup>	10.2 ± 0.20 <sup>C</sup>	13.0 ± 0.65 <sup>B</sup>
18:3n-3	2.7 ± 0.27 <sup>A</sup>	7.1 ± 0.92 <sup>B</sup>	2.4 ± 0.36 <sup>A</sup>	6.9 ± 0.50 <sup>B</sup>	1.9 ± 0.12 <sup>A</sup>
18:4n-3*	0.04 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.2 ± 0.03 <sup>AC</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.3 ± 0.09 <sup>C</sup>	0.0 ± 0.00 <sup>B</sup>
Σ20-24SFA	1.0 ± 0.12 <sup>AB</sup>	1.1 ± 0.10 <sup>AB</sup>	1.4 ± 0.14 <sup>A</sup>	1.0 ± 0.11 <sup>AB</sup>	0.7 ± 0.07 <sup>B</sup>
Σ20:1*	0.3 ± 0.07 <sup>AB</sup>	0.3 ± 0.04 <sup>B</sup>	0.5 ± 0.03 <sup>AC</sup>	0.4 ± 0.03 <sup>AB</sup>	1.2 ± 0.05 <sup>C</sup>
20:2n-6	0.1 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>AC</sup>	0.4 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.3 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.4 ± 0.06 <sup>B</sup>
20:3n-6	0.9 ± 0.07 <sup>A</sup>	0.8 ± 0.02 <sup>AB</sup>	0.9 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.8 ± 0.02 <sup>AB</sup>	0.6 ± 0.02 <sup>B</sup>
20:4n-6	6.5 ± 0.31 <sup>A</sup>	6.2 ± 0.31 <sup>A</sup>	8.7 ± 0.38 <sup>B</sup>	8.5 ± 0.46 <sup>B</sup>	9.0 ± 0.60 <sup>B</sup>
20:3n-3*	0.1 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.7 ± 0.08 <sup>BC</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>AB</sup>	0.8 ± 0.04 <sup>C</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>A</sup>
20:4n-3	0.5 ± 0.08 <sup>AB</sup>	0.7 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.2 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.7 ± 0.16 <sup>A</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>B</sup>
20:5n-3	6.3 ± 0.40 <sup>A</sup>	8.8 ± 0.22 <sup>B</sup>	3.8 ± 0.15 <sup>C</sup>	5.3 ± 0.15 <sup>D</sup>	2.7 ± 0.30 <sup>E</sup>
22:4n-6	0.4 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.3 ± 0.05 <sup>B</sup>	0.3 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.3 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.6 ± 0.05 <sup>C</sup>
22:5n-6*	0.5 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.2 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.7 ± 0.21 <sup>A</sup>	0.6 ± 0.08 <sup>A</sup>
22:5n-3*	3.9 ± 0.65 <sup>ABC</sup>	5.6 ± 0.19 <sup>AC</sup>	2.1 ± 0.08 <sup>B</sup>	4.3 ± 0.21 <sup>AC</sup>	2.2 ± 0.20 <sup>BC</sup>
22:6n-3	3.6 ± 0.36 <sup>A</sup>	3.1 ± 0.10 <sup>A</sup>	6.2 ± 0.30 <sup>B</sup>	3.3 ± 0.20 <sup>A</sup>	5.9 ± 0.55 <sup>B</sup>
24:1*	0.3 ± 0.05 <sup>A</sup>	0.5 ± 0.07 <sup>A</sup>	1.8 ± 0.26 <sup>B</sup>	0.5 ± 0.06 <sup>A</sup>	0.7 ± 0.10 <sup>AB</sup>
Сумма ЖК	2.8 ± 0.38 <sup>A</sup>	1.6 ± 0.05 <sup>A</sup>	6.1 ± 0.39 <sup>B</sup>	5.6 ± 0.39 <sup>B</sup>	6.6 ± 0.96 <sup>B</sup>

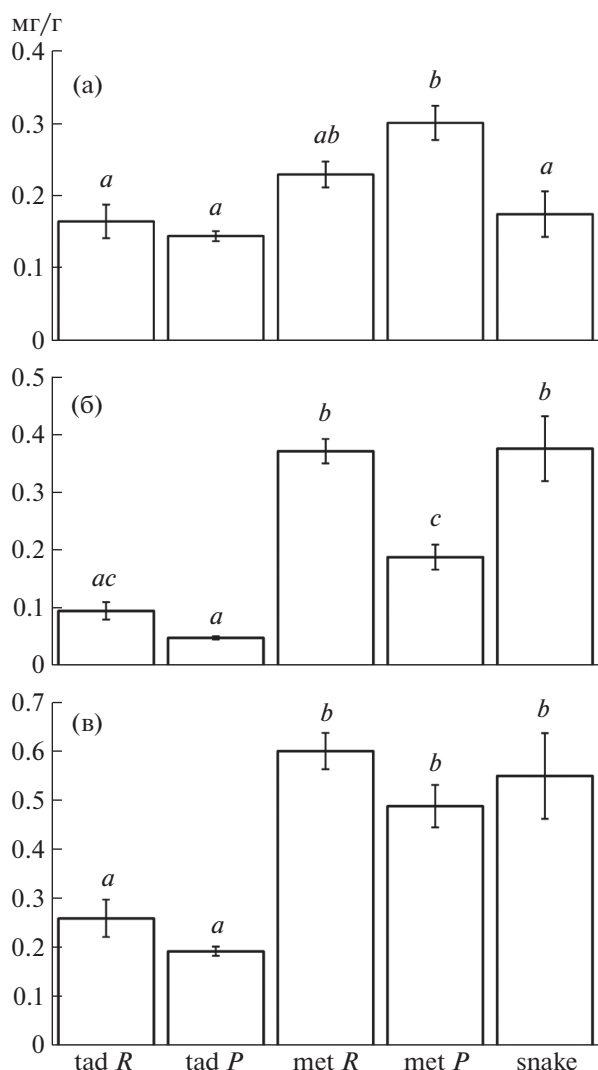
Средние с нормальным распределением, обозначенные одинаковой буквой (по строкам) не имеют достоверных различий ( $p > 0.05$ ) по HSD-тесту Тьюки; средние, отмеченные \* (ненормальное распределение), сравнивались непараметрическим тестом Краскела–Уоллиса. Старицы р. Хопёр, заповедник Приволжская лесостепь (Пензенская область), июнь 2015 г. (амфибии) и 2018–2019 гг. (ужи).

летков *R. arvalis* и ужей уровень 22:6n-3 (ДГК) был достоверно выше, чем у обоих видов головастика и у сеголетков *P. vespertinus* (табл. 1).

Сравнивая состав ЖК головастика каждого вида с сеголетками, следует отметить, что у головастика уровень линолевой и арахидоновой кислоты 20:4n-6 (маркеров пищи наземного происхожде-

ния [10]) был достоверно ниже, чем у сеголетков (табл. 1). Напротив, уровни ЭПК – маркера пищи водного происхождения [10], у головастика был выше, чем у сеголетков (табл. 1).

Несмотря на то что пробы ужей были взяты в другие годы, чем пробы амфибий, сравнивая составы их ЖК, можно отметить достоверно более



**Рис. 2.** Среднее содержание (мг/г сырой массы  $\pm$  стандартная ошибка) в биомассе лягушек и ужей: (а) эйкозапентаеновой кислоты; (б) докозагексаеновой кислоты; (в) их суммы; tad R – головастики *R. arvalis*, tad P – головастики *P. vespertinus*, met R – сеголетки *R. arvalis*, met P – сеголетки *P. vespertinus*, snake – *N. natrix*. Старицы р. Хопёр, заповедник Приволжская лесостепь (Пензенская область), июнь 2015 г. (амфибии) и 2018–2019 гг. (ужи).

низкий уровень 16:0, 15–17VFA и ЭПК, и достоверно более высокий уровень 18:1n–9 и 22:4n–6 у ужей (табл. 1).

Измерение содержания в биомассе физиологически значимых ПНЖК, ЭПК и ДГК (мг/г сырой массы), характеризующее качество органического вещества, передаваемого по трофическим сетям, дало следующие результаты. Максимальное содержание ЭПК было обнаружено у сеголетков *P. vespertinus* (рис. 2). Максимальное содержание ДГК отмечено для сеголетков *R. arvalis* и ужей (рис. 2). Суммарное содержание ЭПК+ДГК у се-

голетков обоих видов и ужей было достоверно выше, чем у головастиков (рис. 2), что свидетельствует о накоплении этих незаменимых ПНЖК в биомассе амфибий при метаморфозе, а также в биомассе ужей как консументов высшего уровня по отношению к амфибиям.

Таким образом, использование жирных кислот в качестве биомаркеров (более высокие уровни незаменимой линолевой кислоты 18:2n–6) показало, что сеголетки остромордой лягушки *R. arvalis* в своем рационе имеют большую долю наземной пищи, чем сеголетки чесночницы *P. vespertinus*. Отличия по маркерам, возможно, связаны с развитием этих двух видов, которое различается сроками и продолжительностью [11]. Это скорее всего связано с тем, что головастики остромордой лягушки заканчивают метаморфоз раньше, и начинают выходить из водоема в начале июня, в то время как выход чесночницы начинается в конце июня и продолжается до августа. Соответственно сеголетки остромордой лягушки раньше чесночницы переходят на питание наземной пищей.

Достоверно более высокий уровень ДГК в мышечной ткани, вероятно, свидетельствует о том, что сеголетки *R. arvalis* и ужи более подвижны: интенсивнее (быстрее и/или дольше) двигаются, чем сеголетки *P. vespertinus*, что соответствует наблюдениям за образом жизни этих видов. Чесночницы преимущественно активны по ночам, в то время как для остромордой лягушки характерна и дневная активность [12]. При этом уровни биохимического предшественника, ЭПК, у сеголетков *R. arvalis* и ужей ниже, чем у головастиков обоих видов амфибий и сеголеток *P. vespertinus*. Можно заключить, что поскольку пищевые источники ДГК в наземных экосистемах отсутствуют, высокий уровень ДГК сеголетков *R. arvalis* и ужей может обеспечиваться только за счет синтеза из биохимических предшественников, вероятно, содержащихся в пище водного происхождения.

Сравнительно высокое суммарное содержание ЭПК+ДГК в биомассе ужей свидетельствует о важной роли этого амфибиотического животного в переносе этих незаменимых ПНЖК из водных экосистем на сушу.

Накопление ЭПК и ДГК в верхних звеньях водных и водно-наземных трофических сетей было обнаружено и в других экосистемах [13]. В целом среднее содержание ЭПК и ДГК в биомассе лягушек и ужей от 0.2 до 0.8 мг/г сырой массы было сопоставимо со средним содержанием этих кислот у некоторых видов рыб отр. Карпообразных [14].

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят директора Государственного природного заповедника «Приволжская лесостепь» А.Н. Добролюбова и старшего научного сотрудника

заповедника В.В. Осипова за помощь в организации исследований.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00920.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ермохин М.В., Сущик Н.Н., Табачишин В.Г., и др. Амфибии как вектор переноса длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот омега-3 из водных экосистем на наземные // Доклады академии наук. 2018. Т. 481. № 2. С. 216–218.
2. Бакиев А.Г. Змеи волжского бассейна в питании позвоночных животных // Современная герпетология. 2007. Т. 7. Вып. 1/2. С. 124–132.
3. Клёнина А.А. Ужовые змеи (Colubridae) Волжского бассейна: Морфология, питание, размножение. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Тольятти, 2015. 158 с.
4. Чугуевская Н.М. Ужи (Serpentes, Colubridae, *Natrix*) Волжского бассейна: экология и охрана. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Тольятти, 2005. 179 с.
5. Гаранин В.И. Амфибии и рептилии в питании позвоночных // Природные ресурсы Волжско-Камского края: Животный мир. Казань, Вып. 4. 1976. С. 86–111.
6. Фионина Е.А. О разорении гнезд наземно гнездящихся воробьиных птиц обыкновенным ужом *Natrix natrix* в Окском заповеднике // Мониторинг редких видов животных и растений и среды их обитания в Рязанской области. 2008. С. 314–315.
7. Шляхтин Г.В., Табачишин В.Г., Завьялов Е.В. Экология питания обыкновенного ужа (*Natrix natrix*) на севере нижнего Поволжья // Современная герпетология. 2005. Т. 3/4. С. 111–116.
8. Павлов П.В. Предварительные данные исследования фауны рептилий в заповеднике “Приволжская лесостепь” // Современная герпетология: Сб. науч. тр. Вып. 1. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 2000. С. 60–65.
9. Whiles M.R., Gladyshev M.I., Sushchik N.N., et al. Fatty acid analyses reveal high degrees of omnivory and dietary plasticity in pond-dwelling tadpoles // Freshwater Biology. 2010. V. 55 (7). P. 1533–1547.
10. Makhutova O.N., Sushchik N.N., Gladyshev M.I. Fatty acid—markers as foodweb tracers in inland waters. In: Mehner T., Tockner K., Eds. Encyclopedia of Inland Waters, 2<sup>nd</sup> edition, Vol 4. Elsevier, 2022. P. 713–726.
11. Файзулин А.И., Чихляев И.В., Кузовенко А.Е. Амфибии Самарской области. Тольятти: ООО “Касандра”. 2013. 140 с.
12. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. М.: Т-во научных изданий КМК. 2012. 379 с.
13. Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Makhutova O.N. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land // Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 2013. V. 107. P. 117–126.
14. Gladyshev M.I., Sushchik N.N., Tolomeev A.P., et al. Meta-analysis of factors associated with omega-3 fatty acid contents of wild fish // Reviews in Fish Biology and Fisheries. 2018. V. 28 (2). P. 277–299.

## THE ROLE OF THE GRASS SNAKE *NATRIX NATRIX* (REPTILIA, COLUBRIDAE) IN THE TRANSFER OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS FROM AQUATIC TO TERRESTRIAL ECOSYSTEMS TO LAND

Academician of the RAS Yu. Yu. Dgebuadze<sup>a,b</sup>, L. A. Neymark<sup>a</sup>,  
I. W. Bashinskiy<sup>a,#</sup>, Corresponding Member of the RAS N. N. Sushchik<sup>c,d</sup>,  
A. E. Rudchenko<sup>c,d</sup>, and Corresponding Member of the RAS M. I. Gladyshev<sup>c,d</sup>

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

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

<sup>c</sup>Institute of Biophysics, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center,” Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

As a result of analyses of fatty acid (FA) composition in the grass snake *Natrix natrix* and its food objects, tadpoles and metamorphs of two amphibian species: the moor frog *Rana arvalis* and the Pallas’ spadefoot *Pelobates vespertinus*, it was shown for the first time that the high total content of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids in the biomass of the snake indicates its important role in the transfer of these essential substances from aquatic ecosystems to land. It was found that since food sources of DHA are absent in terrestrial ecosystems, its high level in *R. arvalis* and grass snakes may be provided only by synthesis from biochemical precursors contained in food of aquatic origin.

**Keywords:** eicosapentaenoic (EPA) acid, docosahexaenoic (DHA) acids, amphibians, reptiles, organic matter transfer



УДК 577.218

## TREX-2 КОМПЛЕКС ЧЕЛОВЕКА ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С СУБЪЕДИНИЦАМИ ORC КОМПЛЕКСА

© 2023 г. М. М. Куршакова<sup>1,\*</sup>, академик РАН С. Г. Георгиева<sup>1</sup>, Д. В. Копытова<sup>1</sup>

Поступило 23.07.2023 г.  
После доработки 08.09.2023 г.  
Принято к публикации 10.09.2023 г.

Белковый комплекс TREX-2 является важнейшим комплексом, участвующим в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Ранее у *D. melanogaster* был выделен совместный белковый комплекс TREX-2 с комплексом ORC, показано, что взаимодействие TREX-2 с ORC необходимо для эффективного экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. В данной работе показано, что совместный комплекс TREX2-ORC также образуется в клетках человека.

**Ключевые слова:** TREX-2, GANP, PCID2, Xmas-2, ORC, Orc3, Orc4, экспорт мРНК

**DOI:** 10.31857/S2686738923600607, **EDN:** GQISDZ

Экспрессия генов включает этапы синтеза мРНК, формирования зрелой мРНК частицы и экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. В ходе образования мРНК частиц в ее состав входят различные белки, регулируя процессинг, взаимодействие мРНК с ядерными порами и экспорт мРНК. Ранее у *D. melanogaster* в качестве белкового компонента мРНК частиц нами был описан комплекс TREX-2 [1], показано, что TREX-2 ассоциирован с ядерной порой и необходим для экспорта мРНК из ядра в цитоплазму. Комплексы, гомологичные TREX-2, были охарактеризованы у многих эукариот, в том числе у дрожжей и у человека, показано, что TREX-2 играет ключевую роль в экспорте мРНК в различных организмах [2–4]. Комплекс TREX-2 *D. melanogaster* состоит из белков Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p. Платформой для сборки комплекса является белок Xmas-2, с которым взаимодействуют остальные белки. На основании данных о взаимодействии белков в составе TREX-2, полученных для белка Sac3, гомолога Xmas-2 у дрожжей, и сравнении последовательностей белков предполагают, что на N-конце Xmas-2 располагается РНК-связывающий домен (RRM), далее в области 3'-конца Sac3-GANP домена располагается домен, с которым связываются PCID2 и мРНК, ближе к С-концу белка находится CID-домен, с которым связывается ENY2, ассоциированный с ядерной порой [5–8]. В нашей группе был выде-

лен совместный комплекс TREX-2 с белками ORC комплекса (Origin Recognition Complex) и показана роль этого взаимодействия в экспорте мРНК из ядра [9]. ORC комплекс был впервые описан у почкующихся дрожжей как комплекс, участвующий в инициации репликации [10]. Впоследствии гомологичные комплексы были обнаружены и у других организмов. Комплекс ORC участвует в привлечении на ориджины репликации комплекса Mcm2-7 при участии факторов Cdc6 и Cdt1 [11]. Однако у высших эукариот ORC комплекс и его отдельные субъединицы проявляют дополнительные свойства, не связанные с репликацией [12], в частности, показано взаимодействие белков ORC с различными РНК [13]. В нашей работе было показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицей, и это взаимодействие опосредовано комплексом TREX-2 [9]. Было показано, что субъединицы ORC взаимодействуют с адаптером экспорта NXF1 и необходимы для связывания NXF1 с мРНК частицей. Нокдаун компонентов ORC нарушает экспорт мРНК, что выявляет важную роль ORC в экспортном пути мРНК. Однако остается вопрос, насколько универсальным является данный механизм. Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали существование взаимодействия между субъединицами комплекса TREX-2 и субъединицами комплекса ORC в культуре клеток человека.

У человека TREX-2 комплекс состоит из белка GANP (гомолога Xmas-2), белка PCID2, двух копий белка ENY2, белка DSS1 (гомолога Sem1p), центринов CETN2/CETN3 (гомологов Cdc31 белка дрожжей) [4]. ORC комплекс эволюционно консервативен, состоит из шести субъединиц –

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии  
Российской академии наук, Москва, Россия  
\*e-mail: kursha@mail.ru

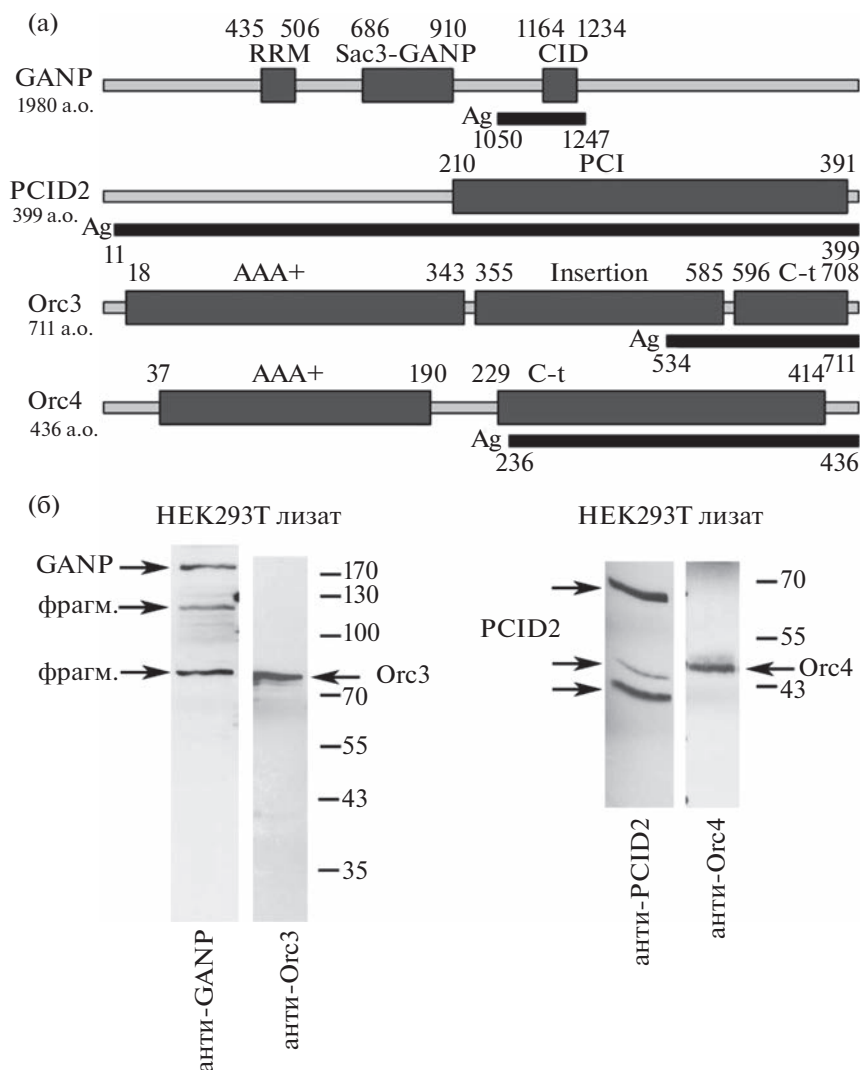
Orc1, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 [14]. Хотя белки с Orc2 по Orc5 сосаждаются друг с другом из лизатов клеток человека в мягких условиях экстракции, общий комплекс субъединиц трудно выделить [15]. При экстракции в более жестких условиях несколько белков Orc сосаждаются со стехиометрическими количествами других неидентифицированных белков, но не с одной из известных субъединиц ORC.

Ранее в очищенном совместном TREX-2-ORC комплексе *D. melanogaster* были найдены субъединицы Orc1, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6. Было исследовано прямое взаимодействие каждого из найденных белков ORC с компонентами TREX-2 — Xmas-2, PCID2, ENY2 [9]. Мы показали, что из всех белков ORC субъединица Orc3 является наиболее сильно ассоциированной с TREX-2 комплексом и мРНК частицей, связываясь вместе с ENY2 с С-концом Xmas-2 [9, 16, 17]. Orc4 наиболее эффективно связывается с PCID2 [9]. Основываясь на этих данных, для исследования существования у человека белкового комплекса, гомологичного комплексу TREX-2-ORC, были решено получить антитела к GANP и PCID2 субъединицам TREX-2 человека и к Orc3 и Orc4 субъединицам ORC человека. Была проанализированная доменная структура белков и выбраны участки аминокислотных последовательностей для синтеза антигенов (рис. 1а). Для GANP использовали фрагмент 1050 а.о.— 1247 а.о., содержащий последовательность CID-домена, для PCID2 — фрагмент 11 а.о. — 399 а.о., почти полностью совпадающий с последовательностью полноразмерного белка, для Orc3 и Orc4 — фрагменты 534 а.о. — 711 а.о. и 236 а.о. — 436 а.о., соответственно, перекрывающие С-концевые домены белков, которые содержат ДНК-связывающие WH-домены [11]. Были созданы генетические конструкции, кодирующие фрагменты аминокислотных последовательностей белков в рамке с His-тагом. Затем с полученных конструкций была проведена экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*. Белки были очищены из бактериальных лизатов при помощи Ni-NTA агарозы. Далее была проведена иммунизация кроликов соответствующими очищенными белками, при проведении иммунизации были соблюдены все этические нормы работы с животными. Из сыворотки крови иммунизированных животных были афинно очищены поликлональные антитела к белкам GANP, PCID2, Orc3, Orc4 человека. Специфичность антител была протестирована в Вестерн-блот анализе тотальных лизатов культуры клеток человека линии HEK293T (рис. 1б). Антитела к GANP распознавали полноразмерный белок, а также узнавали протеолитические фрагменты массой около 115 и 80 кДа. Ранее было показано, что в клетках HEK293 GANP способен подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием С-концевого фрагмен-

та белка массой около 110–115 кДа, расщепление происходит в области 1024 — 1029 а.о. [18]. Так как наши антитела были получены на участок GANP с 1050 по 1247 а.о., то они способны распознавать как целый белок, так и С-концевые протеолитические фрагменты. Ранее мы показали, что у *D. melanogaster* Xmas-2 также подвергаются разрезанию на N-концевой и С-концевой фрагменты [19]. С-концевой фрагмент Xmas-2 выявлялся в виде полосы 100 кДа, а также полосы 80 кДа, представляющей собой, по-видимому, продукт дальнейшей деградации белка. Таким образом, полученные антитела к GANP специфически распознавали GANP и его С-концевые протеолитические фрагменты. Антитела к Orc3 специфично распознавали белок около 80 кДа, близкий к расчетной массе, антитела к Orc4 специфично распознавали белок около 45 кДа, близкий к расчетной массе. Антитела к PCID2 распознавали как основную форму белка массой около 41 кДа, так и две дополнительные модифицированные формы, массой около 46 и 67 кДа. Ранее нами было показано, что в клетках *D. melanogaster* PCID2 присутствует в виде трех форм массой около 42, 47, 52 кДа: 42 кДа соответствует расчетной массе PCID2, а 47 и 52 кДа являются убиквитинилированными модификациями PCID2 [20]. Можно предположить, что в человеческих клетках PCID2 также присутствует в виде основной и модифицированных форм.

Далее с целью проверить существование взаимодействия между TREX-2 и ORC комплексами в клетках человека были проведены эксперименты по иммуносоосаждению субъединиц TREX-2, GANP и PCID2, совместно с субъединицами ORC, Orc3 и Orc4, из тотальных лизатов линии HEK293T (рис. 2). Для того, чтобы исключить не прямое взаимодействие субъединиц TREX-2 и ORC через связывание с ДНК или РНК, при проведении реакций иммуносоосаждения производилась обработка лизатов ДНКазой I и РНКазой А. Выделение лизатов клеток проводили с добавлением ингибиторов фосфатаз (Sigma) для поддержания фосфорилированного состояния белков. Фосфорилирование белков часто бывает необходимым для образования белковых комплексов и поддержания их структуры.

Все антитела эффективно работали в реакциях иммуносоосаждения, осаждавая белки, к которым были получены. В наших условиях антитела к PCID2 преимущественно осаждали основную низкомолекулярную форму PCID2 массой около 41 кДа, слабо осаждавая две остальные формы PCID2. Антитела к GANP осаждали основную форму белка и также сосаждали фрагмент GANP массой около 115 кДа (рис. 2, нижняя панель). Антитела к GANP сосаждали основную форму PCID2, а антитела к PCID2 сосаждали полноразмерный GANP. У *Drosophila* более высокомо-

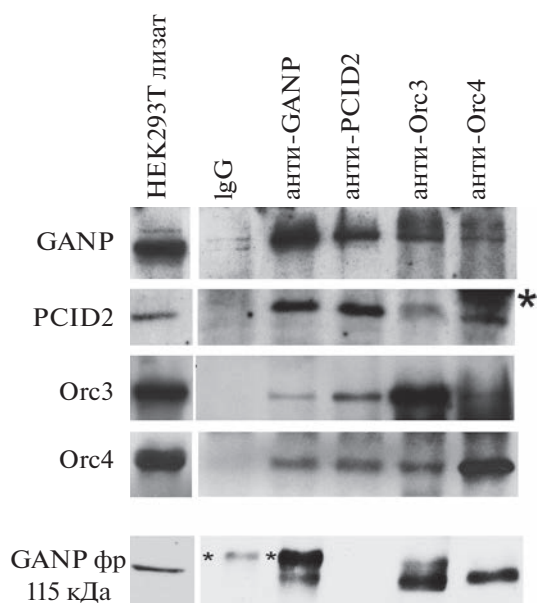


**Рис. 1.** Получение поликлональных антител к субъединицам TREX-2, ORC комплексов. (а) Схема аминокислотных последовательностей белков GANP, PCID2, Orc3 и Orc4. На схеме указаны основные домены белков. Черными прямоугольниками отмечены участки последовательностей, которые использовали для получения антител (Ag). (б) Анализ специфичности антител. Вестерн-блот анализ лизата HEK293T клеток с использованием аффинно-очищенных антител к GANP, PCID2, Orc3 и Orc4. Стрелками указаны формы белков, соответствующие их молекулярной массе, а также протеолитические формы GANP (фрагм.), модифицированные формы PCID2.

лекулярные формы PCID2 являются модификациями основной формы, и в отличие от основной, не связываются с Xmas-2 [20]. GANP также не ассоциировался с высокомолекулярными формами PCID2. GANP и PCID2 связываются в составе TREX-2 комплекса, поэтому в обоих случаях антитела соосаждают TREX-2. При этом антитела к GANP и PCID2 уверенно соосаждали как Orc3, так и Orc4. Антитела к Orc3 и Orc4 слабо соосаждали друг друга, что согласуется с литературными данными о том, что компоненты ORC во многих тканях имеют различный уровень экспрессии и их достаточно трудно выделить вместе в одном комплексе [15]. Антитела к Orc3 и к Orc4 соосаждали полноразмерный белок GANP. Также антитела к Orc3 и к Orc4 соосаждали низкомо-

лекулярную форму PCID2. Таким образом, в HEK293T клетках человека некоторая часть белков ORC ассоциирована с TREX-2 комплексами.

Вероятно, в составе общего комплекса Orc3 может непосредственно взаимодействовать как с GANP, так и с PCID2, так как антитела к обоим белкам достаточно эффективно осаждают Orc3. Интересно, что вместе с Orc4 достаточно эффективно соосаждается PCID2, что может указывать на их прямое взаимодействие в комплексе. Полученные результаты позволяют предположить, что в составе совместного комплекса между субъединицами ORC и субъединицами TREX-2 существуют множественные взаимодействия. Интересно, что при исследовании прямых взаимодействий субъединиц в составе общего TREX-2-ORC комплекса



**Рис. 2.** Анализ взаимодействия компонентов TREX-2 и ORC комплексов. Вестерн-блот анализ иммуноосаждения полноразмерных белков, иммуноосаждения С-концевого фрагмента GANP (нижняя панель) из лизатов HEK293T клеток при помощи антител к субъединицам TREX-2 – белкам GANP, PCID2, антител к субъединицам ORC – белкам Orc3 и Orc4. Указаны детектируемые белки. Бенды, соответствующие сигналам от цепей антител отмечены как “\*”.

*D. melanogaster* было показано, что Orc3 наиболее эффективно связывается с Xmas-2 и ENY2 субъединицами TREX-2 [9]. Orc3 в комплексе с ENY2 ассоциируется с С-концевой областью Xmas-2, содержащей CID-домен [16, 17]. Orc4 наиболее эффективно связывается с PCID2, Orc3 также связывается с PCID2 [9]. Наши данные позволяют предположить, что в клетках человека общий комплекс TREX-2 с белками ORC может иметь сходное строение с TREX-2-ORC комплексом *D. melanogaster*.

Интересно, что при выделении лизатов из HEK 293T клеток в присутствии ингибиторов фосфатаз антитела к Orc3 и Orc4 так же, как и антитела к GANP, соосаждали С-концевой протеолитический фрагмент GANP размером около 115 кДа (рис. 2, нижняя панель). Интересно, что в иммуноосаждениях из лизатов S2 клеток *D. melanogaster* в присутствии ингибиторов фосфатаз антитела к Orc3 также способны соосаждать С-концевой протеолитический фрагмент Xmas-2. Можно предположить, что при определенных условиях белки ORC способны ассоциироваться не только с полноразмерным GANP, но и с его С-концевым протеолитическим фрагментом.

Исследуемые компоненты TREX-2 и ORC также соосаждались в аналогичных условиях в реакциях иммуноосаждения из лизатов клеток человека линии A375. Таким образом, в клетках человека раз-

личных линий было обнаружено взаимодействие между TREX-2 комплексом и субъединицами комплекса ORC. Можно предположить, что у человека существует совместный комплекс TREX-2 с ORC, аналогичный выделенному нами ранее TREX-2-ORC комплексу *D. melanogaster*. Его строение и функции – вопрос, на который должны дать ответ дальнейшие исследования.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-00721.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V. et al. // The EMBO journal. 2007. V. 26. № 24. P. 4956–4965.
2. Fischer T., Strasser K., Racz A. et al. // The EMBO journal. 2002. V. 21. № 21. P. 5843–5852.
3. Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J. et al. // Cell. 2004. V. 116. № 1. P. 75–86.
4. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. // Nucleic acids research. 2012. V. 40. № 10. P. 4562–4573.
5. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. // Molecular cell. 2009. V. 33. № 6. P. 727–737.
6. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E. and Stewart M. // Nature structural & molecular biology. 2012. V. 19. № 3. P. 328–336.
7. Dimitrova L., Valkov E., Aibara S. et al. // Structure. 2015. V. 23. № 7. P. 1246–1257.
8. Jani D., Valkov E., Stewart M. // Nucleic acids research. 2014. V. 42. № 10. P. 6686–6697.
9. Kopytova D., Popova V., Kurshakova M. et al. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. № 10. P. 4920–4933.
10. Bell S.P. and Stillman B. // Nature. 1992. V. 357. P. 128–134.
11. Bleichert F. // Current opinions in structural biology. 2019. V. 59. P. 195–204.
12. Sasaki T. and Gilbert D.M. // Current opinions in cell biology. 2007. V. 19. № 3. P. 337–343.
13. Hoshina S., Yura K., Teranishi H. et al. // Journal of Biological Chemistry. 2013. V. 288. P. 30161–30171.
14. Bleichert F., Botchan M.R., Berger J.M. // Nature. 2015. V. 519. P. 321–326.
15. Thome K.C., Dhar S.K., Quintana D.G. et al. // Journal of Biological Chemistry. 2000. V. 275. № 45. P. 35233–35241.
16. Popova V.V., Georgieva S.G., Kopytova D.V. // Biochemistry and molecular biology journal. 2016. V. 2. P. 2–14.
17. Кушакова М.М., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. // Доклады АН. 2021. Т. 496, С. 66–69.
18. Wickramasinghe V.O., McMurtrie P., Marr J. et al. // Journal of molecular biology. 2011. V. 406. № 3. P. 355–361.
19. Кушакова М.М., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. // Доклады АН. 2023. Т. 509. № 1. С. 166–169.
20. Glukhova A.A., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N. et al. // RNA Biology. 2021. V. 19. P. 1–12.

## THE HUMAN TREX-2 COMPLEX INTERACTS WITH SUBUNITS OF THE ORC COMPLEX

M. M. Kurshakova<sup>a,#</sup>, Academician of the RAS S. G. Georgieva<sup>a</sup>, and D. V. Kopytova<sup>a</sup>

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

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

The TREX-2 protein complex is the key complex involved in the export of mRNA from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores. Previously, a joint protein complex of TREX-2 with ORC was isolated in *D. melanogaster*, it was shown that the interaction of TREX-2 with ORC is necessary for efficient mRNA export from the nucleus to the cytoplasm. In this work, we show that the TREX2-ORC joint complex is also formed in human cells.

*Keywords:* TREX-2, GANP, PCID2, Xmas-2, ORC, Orc3, Orc4, mRNA export